

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Struktur von ABCE1

Annette Karcher

aus

München

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Roland Beckmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am

.....

Annette Karcher

Dissertation eingereicht am 03.05.2007

1. Gutachter:	Prof. Dr. Roland Beckmann
2. Gutachter:	Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen

Mündliche Prüfung am 02.07.2007

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Juli 2007 am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner angefertigt.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit und die Gewährung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten am Genzentrum.

Großer Dank gilt den Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Hopfner, besonders Alfred Lammens, Dr. Nora Assenmacher und Harald Dürr, für die gute Arbeitsatmosphäre, die Anregungen und die freundliche Unterstützung. Weiterhin möchte ich Alexandra Schele für ihre Hilfsbereitschaft danken, die zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen hat. Dr. Nora Assenmacher und Dr. Katja Wenig möchte ich für die Korrektur der schriftlichen Arbeit danken.

Einzelne Teile dieser Arbeit wurden in einer erfolgreichen Kooperation durchgeführt. Dafür danke ich Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, Birgit Märtens und Michaela Vedecnik, für die immer hilfsbereite Zusammenarbeit.

Herrn Reinhold Härtel danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei der Lösung vieler technischer Probleme.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Mutter, die mich in dieser arbeitsintensiven Zeit nach allen Kräften unterstützt haben.

**„Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.“**

Mephistopheles in Faust - Der Tragödie erster Teil
Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	ABC ATPasen.....	S. 1
1.2	ABCE1 ist ein Mitglied der „ATP binding cassette“ Familie	S. 3
1.3	Funktion von ABCE1	S. 8
1.4	Biologische Funktionen von Eisen-Schwefel-Clustern	S. 13
1.5	Die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese	S. 15
1.6	Strukturbestimmung mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse	S. 16
1.6.1	Proteinkristallisation	S. 17
1.6.2	Entstehung von Reflexen	S. 17
1.6.3	Der Strukturfaktor und die Elektronendichte.....	S. 19
1.6.4	Bestimmung der Phasen.....	S. 20
1.6.5	Die Pattersonfunktion	S. 21
1.6.6	Direkte Methoden	S. 21
1.6.7	“Single Wavelength Anomalous Dispersion” (SAD) und “Multiple Wavelengths Anomalous Dispersion” (MAD).....	S. 22
1.6.8	Molekularer Ersatz.....	S. 24
1.6.9	Verbesserung der Phasen	S. 25
1.6.10	Strukturverfeinerung.....	S. 26

<u>2. Zielsetzung</u>	S. 28
------------------------------------	-------

3. Material und Methoden

3.1	Materialien	S. 30
3.2	Methoden der Molekularbiologie	S. 30
3.2.1	Isolierung von DNA.....	S. 30
3.2.2	Konzentration und Reinheit von DNA	S. 30
3.2.3	Klonierung	S. 31
3.2.4	Restriktionsverdau	S. 31
3.2.5	Oligonukleotide.....	S. 31
3.2.6	Oligonukleotide zur DNA Sequenzierung.....	S. 33
3.2.7	Mutanten von ABCE1.....	S. 33
3.2.8	Plasmide	S. 34

3.2.8.1	Kommerziell verfügbare Plasmide	S. 34
3.2.8.2	Modifizierte Plasmide mit Strep-tag II	S. 35
3.2.9	ABCE1 wurde aus verschiedenen Organismen kloniert.....	S. 36
3.3	Methoden der Mikrobiologie	S. 38
3.3.1	Verwendete Bakterienstämme	S. 38
3.3.2	Insektenzellen	S. 38
3.3.3	Medien	S. 39
3.3.3.1	Medien für Bakterien	S. 39
3.3.3.2	Medium für Insektenzellen	S. 40
3.3.4	Konzentrationen von Antibiotika und IPTG.....	S. 40
3.3.5	Transformation von <i>E. coli</i>	S. 40
3.3.6	Markierung mit Selenomethionin	S. 41
3.3.7	Herstellung der Baculovirus-DNA	S. 41
3.4	Methoden der Proteinbiochemie	S. 42
3.4.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	S. 42
3.4.2	Proteinexpression in Insektenzellen durch rekombinante Baculoviren	S. 43
3.5	Proteinreinigung.....	S. 44
3.5.1	Verwendete Puffer	S. 44
3.5.2	Zellaufschluss und Hitzeschritt.....	S. 44
3.5.3	Ni-NTA Affinitätschromatografie	S. 45
3.5.4	Ionenaustauschchromatografie	S. 45
3.5.5	Strep-tag Affinitätschromatografie	S. 46
3.5.6	Gelfiltrationschromatografie.....	S. 46
3.5.7	Zusammenfassung der verwendeten Chromatografieschritte.....	S. 46
3.6.	Partielle Proteolyse	S. 47
3.7	Proteinanalyse	S. 48
3.7.1	SDS-PAGE	S. 48
3.7.2	Absorptionsspektrum	S. 48
3.7.3	Western-Blot	S. 48
3.8	Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster.....	S. 49
3.9	Kristallisation.....	S. 50
3.10	Datensammlung, Strukturbestimmung, Modellbau und Verfeinerung.....	S. 50

4. Ergebnisse

4.1	Klonierung und Reinigung von ABCE1 aus <i>Pyrococcus furiosus</i> und aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	S. 52
4.2	Proteolytischer Verdau von ABCE1 aus <i>Pyrococcus furiosus</i> und <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	S. 53
4.3	Klonierung und Reinigung der ABC ATPase Domänen von ABCE1 aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	S. 54
4.4	Kristallisation der ABC ATPase Domänen von ABCE1 aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	S. 55
4.5	Kristallisation und Strukturbestimmung der Selenomethionin substituierten ABC ATPase Domänen aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	S. 56
4.6	Struktur von <i>pfu</i> ABCE1 N2	S. 58
4.6.1	Die Nukleotidbindungsdomänen	S. 59
4.6.2	Das aktive Zentrum	S. 62
4.6.3	Die Helix-Loop-Helix Domäne und die Scharnierregionen	S. 63
4.6.4	Konservierte Bereiche	S. 66
4.7	Das verbesserte Konstrukt ABCE1 Δ FeS aus <i>Pyrococcus furiosus</i> (<i>pfu</i> ABCE1 Δ FeS)	S. 67
4.7.1	Konstruktion von <i>pfu</i> ABCE1 Δ FeS	S. 67
4.7.2	Kristallisation des Proteins ABCE1 Δ FeS aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	S. 68
4.8	Kristallisation und Strukturbestimmung der ABC ATPase Domäne von ABCE1 aus weiteren Organismen	S. 71
4.9	Mutanten von ABCE1	S. 74
4.9.1	Mutationen im D-Loop: Die Y244F Mutante	S. 74
4.9.2	Mutanten des aktiven Zentrums	S. 76
4.10	Vergleich der Proteinstrukturen von ABCE1 Δ FeS	S. 77
4.11	Der Eisen-Schwefel-Cluster	S. 78
4.11.1	Vorarbeiten für die Kristallisation von <i>pab</i> ABCE1	S. 79
4.11.2	Klonierung und Reinigung von <i>pab</i> ABCE1 mit N-terminalem Strep-Tag II	S. 81
4.11.3	Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster von <i>pab</i> ABCE1	S. 82
4.11.4	Kristallisation, Datensammlung, Strukturbestimmung und Verfeinerung	S. 84
4.12	Die Struktur von <i>pab</i> ABCE1	S. 86
4.13	Oxidation durch Luftsauerstoff	S. 88

4.14	Expression des Proteins ABCE1 aus <i>S. cerevisiae</i> in Baculovirus infizierten Insektenzellen	S. 89
4.15	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	S. 90
4.16	Mutationen in Kollaboration mit Birgit Märtens, Genzentrum, München	S. 91
<u>5. Diskussion</u>		
5.1	Konservierung von ABCE1	S. 95
5.2	Der Eisen-Schwefel-Cluster.....	S. 96
5.2.1	Die Struktur der Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne von ABCE1	S. 97
5.2.2	Konservierte Aminosäuren der FeS-Domäne	S. 103
5.2.3	Mutationen in der Eisen-Schwefel-Cluster Domäne	S. 105
5.2.4	Die Eisen-Schwefel-Cluster Domäne hat enge Kontakte zur NBD 1	S. 106
5.3	Die Scharnierregion und die Helix-Loop-Helix Domäne	S. 108
5.4	Die strukturell diverse Region	S. 110
5.5	Das aktive Zentrum.....	S. 112
5.6	Biologische Funktion von ABCE1	S. 118
<u>6. Zusammenfassung</u>		S. 119
<u>7. Anhang</u>		
	Abkürzungen.....	S. 122
	Sequenzalignment	S. 122
<u>8. Literaturverzeichnis</u>		S. 134
<u>9. Lebenslauf</u>		S. 141
<u>10. Publikationen</u>		S. 143

1. Einleitung

1.1 ABC ATPasen

Ein großer Teil des Proteoms in jedem Organismus besteht aus Proteinen, die Nukleosidtriphosphate (NTP) binden und hydrolysieren können. P-loop NTPasen sind mit 10 bis 18% aller Genprodukte die am weitesten verbreiteten NTPasen. Die meisten Vertreter der P-Loop NTPasen hydrolysieren die β - γ -Phosphatbindung eines gebundenen NTP-Moleküls und nutzen die hierdurch freigesetzte Energie zur Konformationsänderung. Auf Sequenzebene werden P-Loop NTPasen durch zwei stark konservierte Motive charakterisiert, das Walker-A Motiv und das Walker-B Motiv. Das Walker-A Motiv bildet einen flexiblen N-terminalen Loop („P-Loop“), der einen β -Strang mit einer α -Helix verbindet. C-terminal vom Walker-A Motiv befindet sich die Walker-B Sequenz, die ein hydrophobes β -Faltblatt bildet, an dessen Ende ein konservierter Aspartat oder Glutamatrest positioniert ist. Über ein Wassermolekül koordinieren diese konservierten Reste ein Mg^{2+} -Ion, welches wiederum die β/γ -Phosphate des Nukleotids stabilisiert (Walker et al., 1982). Struktur- und Sequenzanalysen führten zu einer Einteilung der P-Loop NTPasen in die KG (Kinase-GTPase)-Klasse und die ASCE (aditiional strand, catalytic E)-Klasse (Aravind et al., 2004; Leipe et al., 2002) (Abbildung 1.1). Zu der ASCE Gruppe der P-loop NTPasen gehören die AAA+-, ABC- Superfamilien, (SF1/2) Helikasen, und die RecA/F₁/F₀ Klasse der ATPasen (Aravind et al., 2004; Leipe et al., 2002).

Die ATP binding cassette (ABC) ist eine weit verbreitete, stark konservierte ATPase Domäne. Ursprünglich wurde sie in Transmembrantransportern entdeckt und als ABC Domäne bezeichnet. ABC Transporter umfassen eine große und sehr divergente Familie von Transmembranproteinen, die spezifisch sehr verschiedene Substanzen von Ionen bis Proteine durch Membranen transportieren. Andere Mitglieder dieser Familie haben bedeutende Aufgaben in wichtigen zellulären Prozessen wie DNA Reparatur (Rad50, MutS, UvrA), Chromosomenmetabolismus („structural maintenance of chromosome“ (SMC Proteine)) oder mRNA Export aus dem Kern (EIF1p).

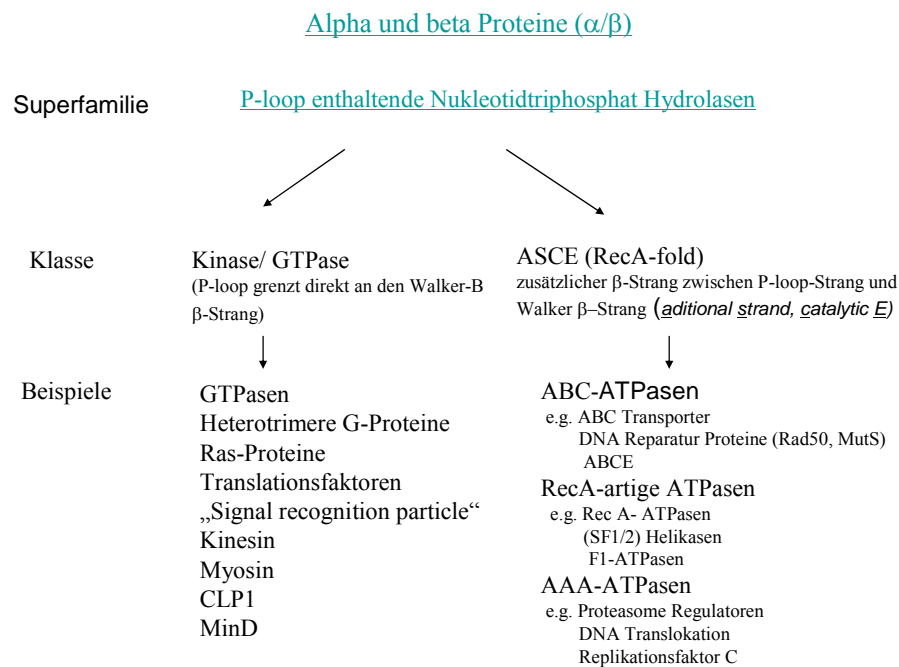


Abbildung 1.1: Einteilung von P-loop NTPasen
P-Loop NTPasen werden strukturell in die KG (Kinase-GTPase)-Klasse und die ASCE („additional strand, catalytic E“)-Klasse unterteilt (Aravind et al., 2004; Leipe et al., 2002). Beide Klassen enthalten viele weitere Proteinsuperfamilien und Proteinfamilien.

In *E. coli* sind 79 ABC Proteinsequenzen gefunden worden, das entspricht 5% des Genoms. Im Menschen sind bisher mindestens 48 ABC Proteine bekannt. ATP wird von den Mitgliedern der ABC Familie hydrolysiert, um eine Vielzahl von biologischen Aufgaben zu erfüllen. So verwendet z.B. das DNA „mismatch repair“ Protein MutS ATP um DNA Basenfehlpaarungen zu erkennen und zu binden (Blackwell et al., 1998), während das DNA Reparaturprotein Rad50 ATP benützt, um Doppelstrangbrüche zu binden (Hopfner et al., 2001).

ABC Proteine sind von hoher medizinischer Relevanz. So sind z.B. Mutationen in dem ABC Transporter CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) die molekulare Basis für die häufige Erbkrankheit cystische Fibrose (Sheppard and Welsh, 1999). „Multiple Drug Resistance“ (MDR) beschreibt das Phänomen, dass Zellen, in der Regel Tumorzellen, eine Resistenz gegenüber Medikamenten haben bzw. entwickeln. Hierfür können Transporter verantwortlich sein, die diese Substanzen/Medikamente wieder aus der Zelle hinausschleusen. Am bekanntesten ist der Transporter MDR1. Das 170 kDa große Glykoprotein war der erste im Menschen charakterisierte ABC-Transporter. Als

ursprüngliche Funktion des MDR1 wird die Entgiftung des Organismus von körperfremden Substanzen angenommen (Gottesman and Pastan, 1993). Viele Defekte in ABC Proteinen können zu Krebs führen. Mutationen in MSH (eukaryotisches MutS Homolog) werden in Verbindung mit angeborenem Darmkrebs gebracht. Bei Defekten der ABC ATPase Rad50 gibt es Fehler in der DNA Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Schäden in Rad50 oder den assoziierten Proteinen NBS1 und Mre11 führen zu einem erhöhten Risiko an „Nijmegen Breakage Syndrom“ oder „Ataxia telangiectasia“ Varianten zu erkranken. Das „Nijmegen Breakage Syndrom“ zeichnet sich durch eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen aus. (Carney et al., 1998; Stewart et al., 1999). Der strukturelle Mechanismus von ABC ATPasen ist also von außerordentlichem biomedizinischem Interesse.

1.2 ABCE1 ist ein Mitglied der „ATP binding cassette“ (ABC) Familie

Aus Sequenzanalysen ist bekannt, dass ABCE1 zur ATP binding cassette (ABC) Proteinfamilie gehört. Es enthält zwei für diese Familie charakteristische und allgemein konservierte ABC Domänen (Hopfner and Tainer, 2003), die Nukleotidbindungsdomänen (NBD 1 und NBD 2). NBD 1 und NBD 2 von ABCE1 sind durch weitere Domänen verbunden. Bemerkenswert ist, dass ABCE1 ein in der Evolution außergewöhnlich hoch konserviertes und in allen getesteten Organismen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*) essentielles Protein ist (Kamath et al., 2003; Winzeler et al., 1999). Kopien von eukaryotischen ABCE1 wurde in Archaeen gefunden, in Eubakterien sind keine Homologe bekannt (Kerr, 2004). Eine Psi-Blast Suche („Position Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool“), mit humanem ABCE1 als Eingabesequenz im Jahr 2004 brachte 39 weitere ABCE1 Sequenzen, wobei 22 ABCE1 Sequenzen aus Eukaryoten und 18 in Archaeen gefunden wurden (Kerr, 2004). Vergleicht man alle Proteine die in Archaeen enthalten sind mit den Proteom des Eukaryoten *S. cerevisiae*, so findet man ABCE1 unter den fünf am höchsten konservierten Proteinen. Bei einem Vergleich des Proteoms des Archaeen *Methanococcus jannaschii* und *S. cerevisiae* ist es sogar das am zweithöchsten konservierte Protein mit einer Sequenzidentität von 45-50% (siehe Anhang). So hohe Sequenzähnlichkeiten, die vergleichbar mit der großen Untereinheit der RNA Polymerase sind, sowie der letale Phänotyp in *S. cerevisiae* und *C. elegans* (Giaever et al., 2002; Kamath et al., 2003) deuten darauf hin, dass ABCE1 ein Schlüsselprotein in der Zellphysiologie von Archaeen und Eukaryoten ist.

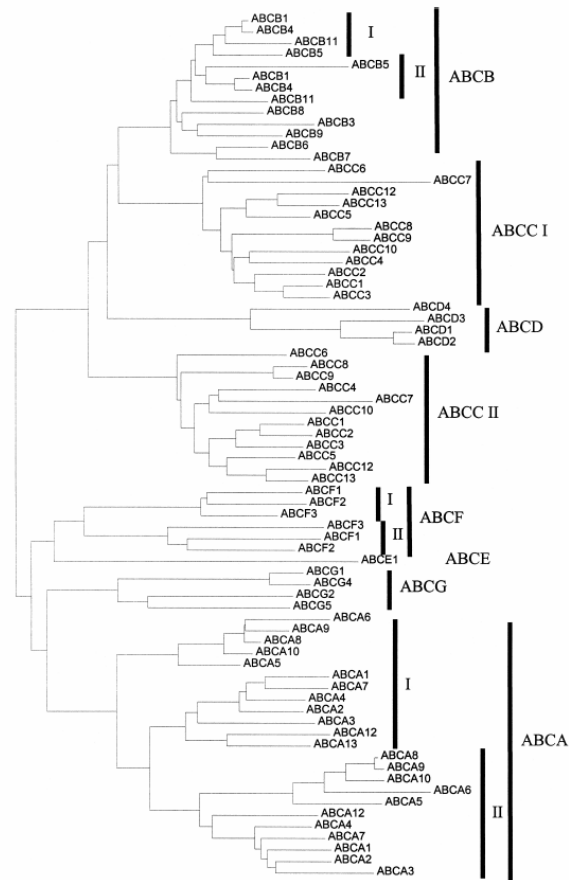


Abbildung 1.2 Eukaryotische ABC Proteine werden in 7 Klassen eingeteilt.
Basierend auf Genomanalysen werden eukaryotische ABC Proteine in 7 Subfamilien (ABCA - ABCF) unterteilt (Kerr, 2004). ABCE1 ist das einzige Mitglied der ABCE Subfamilie (Abbildung aus(Dean et al., 2001)).

Fünf dieser Familien enthalten Proteine mit Transmembranregionen und sind für Membrantransporte verantwortlich (Kerr, 2004). Konformationsänderungen, die durch die Bindung und Hydrolyse von ATP und die ADP Freisetzung entstehen, sind an den Transport von verschiedenen Substanzen gekoppelt. Bei allen Mitgliedern der ABC ATPasen werden

Bindung und Hydrolyse von ATP und die ADP Freisetzung benutzt, um durch einen molekularen „powerstroke“ mechanische Arbeit durch Konformationsänderung zu leisten. Mitglieder der ABCE und ABCF Familie haben keine Transmembranregionen. ABCE1 ist das einzige bekannte Mitglied der eukaryotischen ABCE Subfamilie. Trotz der hohen funktionellen Divergenz zwischen den ABC Proteinen haben alle Mitglieder dieser Familien strukturelle Gemeinsamkeiten (Hopfner et al., 2000). Die Nukleotid Bindungs Domäne (NBD) ist hoch konserviert, sodass ein gemeinsamer Mechanismus für die ATP Hydrolyse erhalten ist. Diese charakteristischen nukleotidbindenden Domänen haben eine gemeinsame Struktur, die wiederum eine Anzahl von speziellen Sequenzmotiven enthalten (Abbildung 1.3). Diese speziellen Sequenzmotive sind für die ATP-Bindung und Hydrolyse entscheidend. Der „Motor“ für den mechanistischen „powerstroke“ besteht bei allen ABC Proteinen aus zwei homo- oder heterodimeren ABC-ATPase Domänen. Diese ATPase Domänen bilden in der ATP gebundenen Form ein Dimer in einer „Kopf-zu-Schwanz-Ausrichtung“ (Hopfner et al., 2000). Im Gegensatz zu vielen anderen bekannten Mitgliedern der ABC Proteinfamilie, die nur eine ATPase Domäne enthalten und nach ATP Bindung ein Homodimer aus zwei Molekülen bilden (Rad50, SMC Proteine) (Hopfner et al., 2000), besitzt ABCE1 zwei ATPase Domänen und bildet nach Bindung von ATP ein „Heterodimer“ aus den beiden, leicht unterschiedlichen ATPase Domänen eines ABCE1 Moleküls.

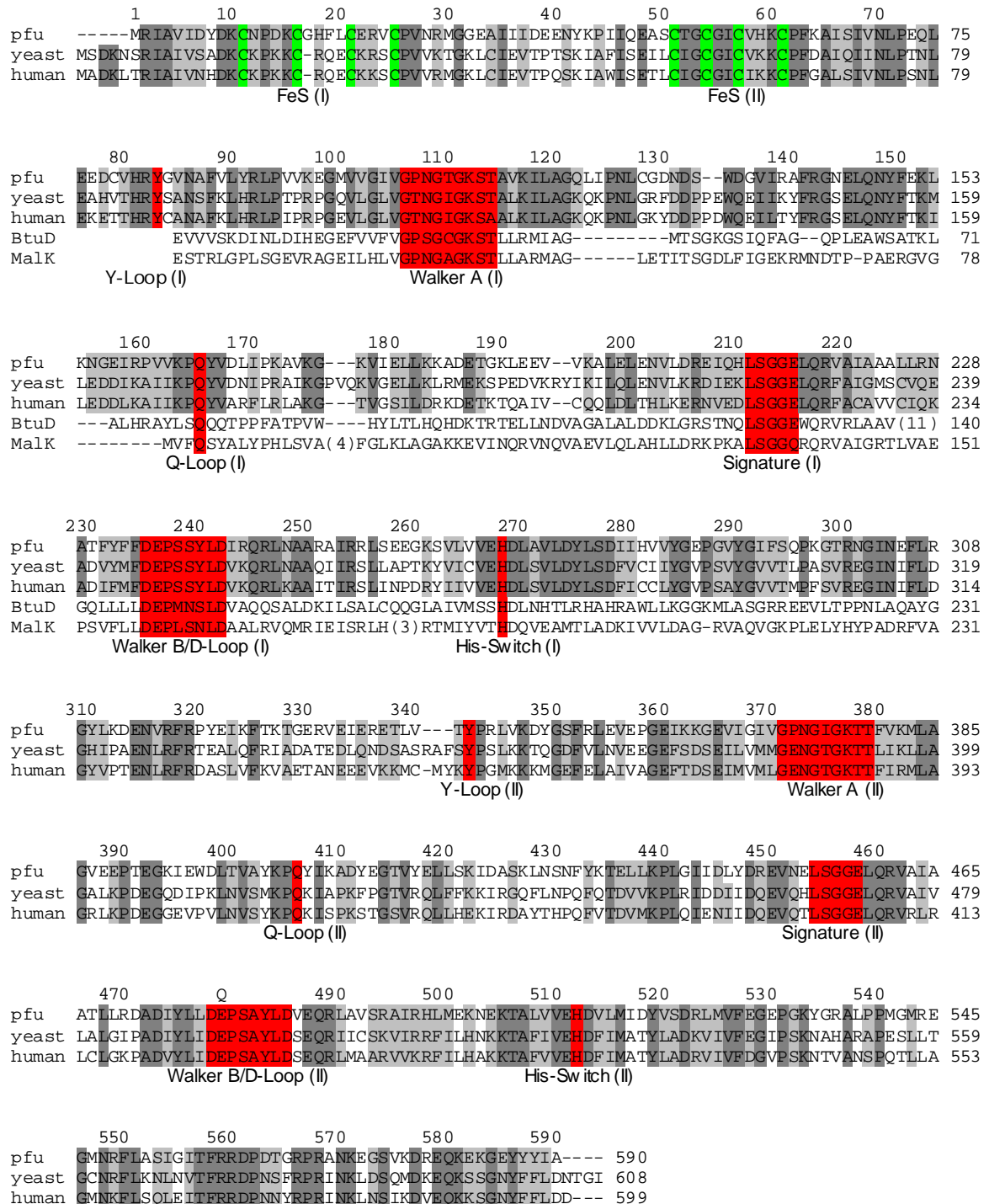


Abbildung 1.3 Sequenzalignment der NBD der ABC Transporter Malk, BtuD und der Sequenz von pfu, yeast und humanem ABCB1.

ABC Proteine haben strukturelle Gemeinsamkeiten (Locher et al., 2002). Die für die ATP Bindung und Hydrolyse wichtigen Sequenzmotive (rot) sind bei allen ABC ATPasen sehr konserviert. (grün: konservierte Cystein, dunkelgrau: identisch, hellgrau: konserviert).

Die Aminosäuresequenz jeder der beiden ca. 200 Aminosäurereste großen ATPase Domänen von ABC Proteinen enthält fünf konservierte Motive (Abbildung 1.4) in zwei Untereinheiten („Lobes“, Abbildung 4.7) (Hopfner et al., 2000; Hung et al., 1998).

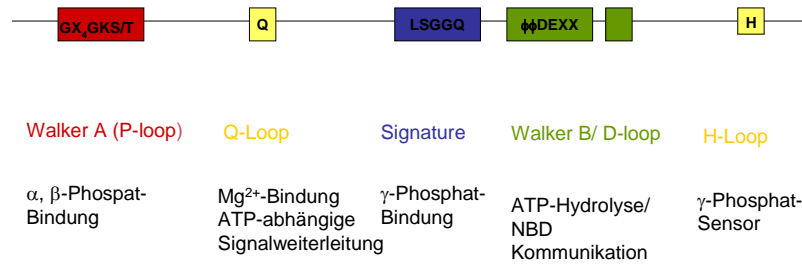


Abbildung 1.4 Konservierte Motive von ABC Proteinen
Die ABC-ATPase Domänen von ABC Proteine enthält fünf konservierte Motive, die für die ATP Bindung und Hydrolyse wichtig sind.

Die erste Untereinheit, mit einem α/β -Fold, enthält die primäre ATP Bindungsstelle mit dem P-loop (Walker-A Motiv, GX₄GKS/T)), dem Q-Loop (mit einem Glutamin) und einem H-Loop (benannt nach dem phylogenetisch konservierten Histidin). Untereinheit 2 ist vorwiegend α -helikal, mit dem für ABC ATPasen charakteristischen Element, einer α -helikalen Subdomäne und dem Signatur-Motiv (C-Loop, LSGGQ). Zwischen beiden Untereinheiten liegt ein gemeinsames β -Faltblatt, welches das Walker-B Motiv (B-Loop, (φφφφDE, φφ, hydrophobe Aminosäure)) und den D-Loop (SAYLD) enthält (Hopfner and Tainer, 2003). Der Q-Loop liegt in einer strukturell diversen Region (SDR). Viele ABC-ATPasen wie ABC Transporter und die Rad50/SMC-Unterfamilie kommunizieren mit anderen Proteinen über Konformationsänderungen in dieser Region (Hopfner and Tainer, 2003).

Essentiell für die Funktion von allen ABC ATPasen ist die Dimerisierung von zwei Nukleotidbindungsdomänen. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass ATP-Bindung, bzw. ADP-Freisetzung die Interaktion der beiden ATPase Domänen kontrolliert (Fetsch and Davidson, 2002; Liu et al., 1999; Moody et al., 2002; van Veen et al., 2000).

Nach der Bindung von ATP an das Walker-A Motiv, das Walker-B Motiv und den Q-Loop der 1. Untereinheit orientieren sich beide Untereinheiten neu. Das ATP γ -Phosphat wird vom Signatur-Motiv einer zweiten NBD erkannt und gebunden. ATP Bindung zwischen dem ABC Signatur-Motiv der einen Domäne und dem Walker-A Motiv der anderen Domäne führt dadurch zur Bildung eines Dimers. Die beiden NBD klappen zusammen und bilden ein NBD-2ATP-NBD Sandwich. ATP Hydrolyse ist folglich nur durch die dimere Struktur der ABC ATPasen möglich. Die durch die ATP-Bindung induzierte Bewegung verursacht wahrscheinlich Konformationsänderungen in benachbarten Domänen. Bei vielen ABC ATPasen werden dadurch regulatorische Domänen verändert. Obwohl die Struktur und die ATP abhängigen biochemischen Vorgänge oft untersucht wurden und von hoher medizinischer Relevanz sind, werden die strukturellen Mechanismen der ABC Enzyme noch nicht vollständig verstanden (Diederichs et al., 2000; Gaudet and Wiley, 2001; Hopfner et al., 2000; Hung et al., 1998; Karpowich et al., 2001; Lewis et al., 2004; Lowe et al., 2001; Schmitt et al., 2003; Smith et al., 2002; Verdon et al., 2003a; Verdon et al., 2003b).

ABCE1 enthält neben der für diese Familie charakteristischen ABC Domänen noch weitere, hoch konservierte Domänen (Abbildung 1.3). Eine cysteinreiche, potentielle Eisen-Schwefel-Cluster Domäne befindet sich am N-Terminus von ABCE1 (Kerr, 2004). Drei weitere stark konservierte Bereiche liegen in der NBD 1 zwischen dem Walker-A Motiv und dem Q-Loop, zwischen den ATPase Domänen und am C-Terminus. Diese Domänen lassen sich bislang keinen bekannten funktionellen Motiven zuordnen.

1.3 Funktion von ABCE1

Über ABCE1 sind einige sehr unterschiedliche Funktionen bekannt. Erstmals beschrieben und charakterisiert wurde ABCE1 1995 als RNase L Inhibitor 1 (RLI1) (Bisbal et al., 1995). Der RNase L/ 2'-5'A Signalweg wird nach viraler Infektion (z.B. HIV) durch Interferon (IFN) induziert und spielt eine wichtige Rolle bei der antiviralen Zellantwort und der Regulation von RNA Stabilität. Typ-I IFN induziert über den Jak-Stat Signalweg die Transkription einer 2',5'-Oligoadenylat-Synthase, die nach Aktivierung durch doppelsträngige RNA ATP zu 2'-5' Oligoadenylate (2'-5'A) umsetzt. Die 2'-5'A abhängige Endonuklease RNase L wird durch doppelsträngige RNA aktiviert und baut daraufhin einzelsträngige RNA z.B. mRNA von der 3' Seite ab, wodurch die Proteinsynthese gehemmt

wird. ABCE1 hemmt die 2'-5'-A abhängige RNase L Aktivierung und damit die antivirale Aktivität von IFN (Bisbal et al., 1995). Der genaue Mechanismus der Wechselwirkung zwischen ABCE1 und RNase L ist jedoch nicht bekannt.

Hinweise darauf, dass die Inhibition von RNase L nicht die einzige endogene, biologische Funktion von ABCE1 sein kann, waren die Ergebnisse einer Psi-Blast Suche, („Position Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool“ (Altschul et al., 1997)), bei der Sequenzkopien von ABCE1 in 40 Organismen von Archaeen bis Eukaryoten (Kerr, 2004) gefunden wurde. Aus diesen 40 Organismen enthalten aber nur drei Organismen RNase L (Mensch, Maus, Ratte).

Erste Zusammenhänge zwischen HIV Replikation und ABCE1 wurden erstmals von Martinand et al. 1999 entdeckt (Martinand et al., 1999). In einem 2002 veröffentlichten Artikel wurde ABCE1 als ein wirtseigenes Protein beschrieben, dass zur Bildung des unreifen „Human immune deficiency virus 1“ (HIV-1)-Kapsids benötigt wird (Zimmerman et al., 2002). Bei der HIV-Kapsid Assemblierung bauen sich ca. 5000 Polypeptide des HIV-1 Strukturproteins Gag zu einem kugelförmigen unreifen Kapsid an der cytosolischen Seite der Plasmamembran zusammen, in welches dann die virale RNA eingeschlossen wird. Für diesen Prozess wird ATP und die wirtszelleneigene 68 kDa schwere ATPase HP68 („Host Protein“, Molekulargewicht 68 kDa = ABCE1) benötigt (Zimmerman et al., 2002). Das HIV-1 Gag Polypeptid besteht aus vier Domänen, der Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsid- und p6-Domäne. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die Nukleokapsiddomäne (NC) mit ABCE1 interagiert. Die NC-Domäne enthält Cystein-Histidin Zentren, die ein Zinkfingermotiv formen und für die Einkapselung der genomischen HIV-1 RNA sorgen. Außerdem enthält die NC-Domäne wichtige Reste für die unspezifische RNA Bindung und Gag-Gag Interaktionen (Lingappa et al., 2006).

ABCE1 ist außerdem mit dem in fast allen Lentiviren enthaltenden Protein Vif und dem wirtseigenen Protein Apobec3G assoziiert (Lingappa et al., 2006; Zimmerman et al., 2002) (Abbildung 1.5). Das Virale Protein Vif macht Viren *in vivo* infektiös, indem es verhindert, das Apobec3G des Wirtes in das Virus verpackt wird. Apobec3G ist eine Cytidin Deaminase, die während der reversen Transkription durch Hypermutationen das virale Genom schädigt. Die genaue Funktion von ABCE1 bei diesem Prozess ist nicht bekannt.

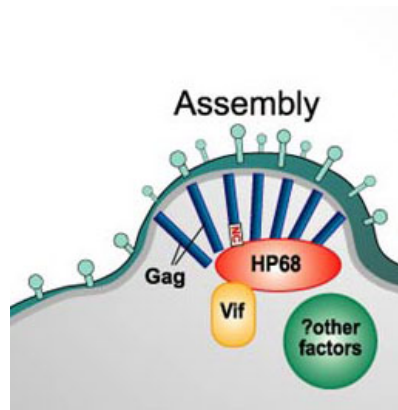


Abbildung: 1.5 **ABCE1 (HP68) ist an der Reifung des HIV1 Kapsids beteiligt.**
 ABCE1 bindet an die Nukleokapsiddomäne von HIV Gag, und an zwei weitere Proteine (Vif, Apobec3G). Abbildung von Drs. Jaisri Lingappa und Wes Sundquist, bearbeitet von John Weddle.

In den letzten Jahren (2004-2005) erschienen drei Publikationen über die zelluläre Funktion von ABCE1. In diesen Arbeiten wird ABCE1 als essentielles Protein für die Ribosomenbiogenese und die Translationsinitiation beschrieben (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Ein mit einem TAP-Tag fusioniertes ABCE1 Protein ließ sich aus Hefezellen zusammen mit eIF3, eIF2 und eIF5 reinigen, wobei die Interaktion mit eIF3 und eIF5 Ribosomen unabhängig war (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005). Nach einer sorgfältigeren Reinigung interagierte ABCE1 noch mit sechs Polypeptiden des Translationsiniationsfaktors 3 (eIF3): eIF3a/TIF32, eIF3b/PRT1, eIF3c/NIP1, eIF3i/TIF34, eIF3g/TIF35 und eIF3j/HCR1. Des Weiteren wurden ribosomale Proteine (RpI3, RpI4, Rps3) und das molekulare Chaperon Hsp70 gefunden. Es ist jedoch bekannt, dass diese Proteine bei „Tandem Affinity Purifications“ (TAP Reinigungen) immer als Kontaminationen auftreten (Gavin et al., 2002). eIF3 ist ein 750 kDa schwerer Multiproteinkomplex, der beim Menschen mindestens 12 Proteine enthält (Siridechadilok et al., 2005). In Hefe enthält eIF3 fünf essentielle Untereinheiten (eIF3a/TIF32, eIF3b/PRT1, eIF3c/NIP1, eIF3i/TIF34 und eIF3g/TIF35) und eine nicht stöchiometrische Untereinheit (eIF3j/HCR1). eIF3 bindet an die 40S ribosomale Untereinheit und vermittelt die Bindung an mRNA, die eine 5'-methylierte Guanodin-Kappe besitzen durch Interaktion mit eIF4F. Virale mRNA kann über eine IRES („internal ribosome entry site“) direkt an eIF3 binden und damit die funktionelle Aufgabe des Kappen-Bindungskomplexes ersetzen. Dadurch hat eIF3 eine wichtige Aufgabe sowohl bei der zellulären als auch bei der viralen Proteinsynthese.

Weiterführende Two-Hybrid Analysen zeigten eine Interaktion von ABCE1 mit eIF3j/HCR1p (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005). Zielgerichtete Mutationen in verschiedenen Domänen von ABCE1 konnten diese Interaktion genauer charakterisieren. So verhinderten Mutationen im Walker-A Motiv von ABCE1 eine HCR1p Bindung, während Mutationen im Eisen-Schwefel-Cluster diese Interaktion nicht unterbrachen (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass ABCE1 *in vivo* mit der ribosomalen 40S Untereinheit wechselwirkt (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005). Da ABCE1 sowohl mit der eIF3 Untereinheit des Präinitiationskomplexes als auch dem 40S Ribosom interagiert, begünstigt es wahrscheinlich den Zusammenbau und die Stabilität des 43S Präinitiationskomplexes. Verglichen mit IF2, eIF3 oder eIF5 befinden sich jedoch geringere Mengen an ABCE1 in der Zelle (Dong et al., 2004). Daher hat ABCE1 vermutlich eine katalytische Funktion und ist kein stöchiometrischer Bestandteil des Präinitiationskomplexes (Dong et al., 2004). Eine reduzierte ABCE1 Konzentration in der Zelle bewirkt eine generelle Störung der Translationsinitiation. Nach Entfernen von ABCE1 aus einem Translationsassay konnte folglich das Protein einer Reporter Luziferase mRNA nicht mehr synthetisiert werden (Dong et al., 2004). Nach dem Ausschalten von ABCE1 in *Saccharomyces cerevisiae in vivo* konnte eine Reduktion der Größe und dem Vorkommen der Polysomen festgestellt werden, nach 8h fiel das Polysomen/ 80S Monosomen Verhältnis auf ~5% im Vergleich zum Wildtyp. Dabei stieg zusätzlich die Menge des freien 40S Ribosomen im Verhältnis zum 60S Ribosom.

Ein Fusionsprotein aus ABCE1 und „green fluorescent protein“ (GFP) konnte auch im Zellkern nachgewiesen werden (Dong et al., 2004), daher könnte ABCE1 im Kern an der 60S Ribosomenbiogenese beteiligt sein. Yarunin et al. konnten mit Northern Analyse zeigen, dass während der 60S Reifung nach einer ABCE1 Depletion 7S prä-rRNA nicht mehr zu 5,8S rRNA prozessiert wurde, die 6S rRNA fehlte völlig (Abbildung 1.6). 7S prä-rRNA ließ sich wie 20S, 18S, 5,8S und 25S rRNA mit ABCE1 kopräzipitieren. Die 7S Reifung ist einer der letzten Schritte in der 60S Ribosomenbiogenese und wird wahrscheinlich von ABCE1 reguliert. Um den Einfluss von ABCE1 an der Ribosomenbiogenese weiter zu untersuchen, wurde ABCE1 daraufhin unter die Kontrolle eines Tetracyclin-regulierten Promoters gestellt. Nach Zugabe von Doxycyclin zeigten die ribosomalen Proteine Rpl25p (ein rRNA bindendes Protein der 60S Untereinheit) und Rps2p (Bestandteil der 40S Untereinheit) eine deutliche Anhäufung im Zellkern (Yarunin et al., 2005). ABCE1 hat demnach auch eine wichtige Rolle

im Kernexport von beiden ribosomalen Untereinheiten (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Darüber hinaus konnte bei der frühen Ribosomenbiogenese 4h nach Ausschalten von ABCE1 eine Anhäufung von 35S rRNA festgestellt werden. Nach 6h war zusätzlich 32S prä-rRNA akkumuliert und eine verminderte 27S und 20S prä-rRNA Konzentration zu beobachten. Zu einem späteren Zeitpunkt war auch die Konzentration der reifen 5,8S und 25S prä-rRNA reduziert (Abbildung 1.6).

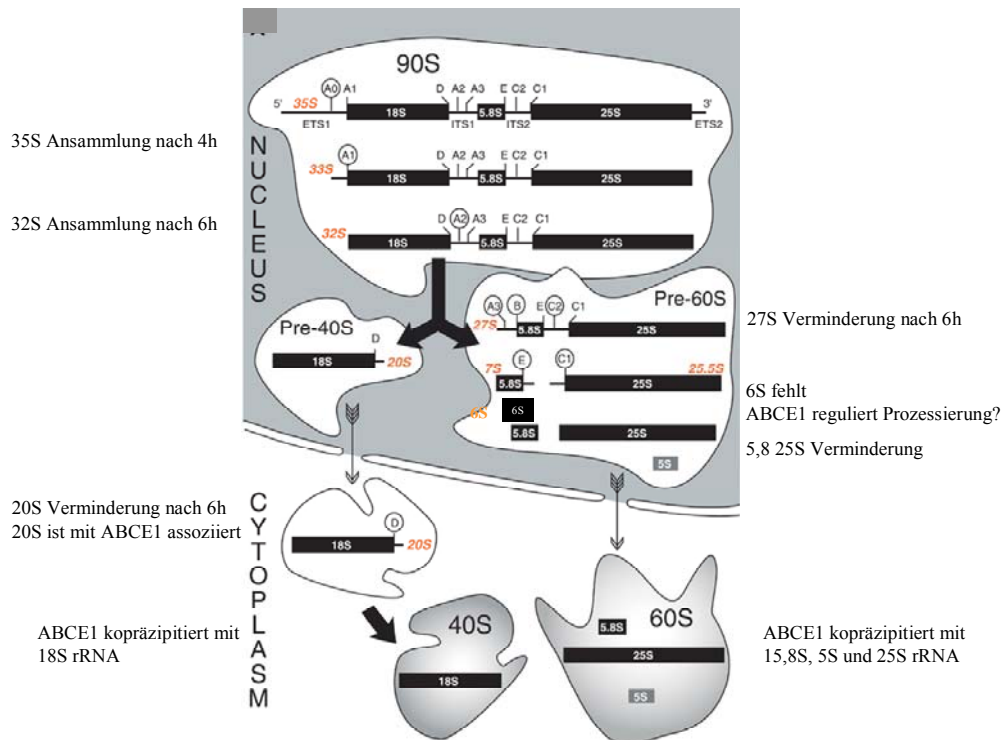


Abbildung 1.6 *Beteiligung von ABCE1 aus S. cerevisiae an der Ribosomenbiogenese*
Das Ausschalten von ABCE1 hat vielfältige Auswirkungen auf die 40S und 60S Ribosomenbiogenese (Yarunin et al., 2005, Abbildung verändert nach Leger-Silvestre et al., 2004)

Da reife rRNA sehr stabil ist und die Konzentration nur durch Zellwachstum abnimmt, ist eine Konzentrationsänderung wesentlich langsamer sichtbar als bei prä-rRNA. Yarunin et al. gehen deshalb davon aus, dass die Depletion von ABCE1 die Prozessierung von prä-rRNA in beiden Synthesewegen für die ribosomalen Untereinheiten vermindert.

ABCE1 hat demnach wahrscheinlich zwei verschiedene Aufgaben in der frühen Proteinsynthese (Kispal et al., 2005): In wachsenden Zellen ist ABCE1 hauptsächlich im Zytoplasma und wird für den Zusammenbau des 43S und 48S Präinitiationskomplexes

verwendet. Weiterhin unterstützt ABCE1 im Zellkern die Reifung und den Kernexport der ribosomalen Untereinheiten. Der Effekt der Depletion von ABCE1 auf die Translationsinitiation ist dabei aber für die Zelle kritischer als der Mangel an Ribosomenuntereinheiten.

1.4 Biologische Funktionen von Eisen-Schwefel-Clustern

ABCE1 ist ein zytoplasmatisches Protein, das am N-Terminus zwei cysteinreiche Regionen enthält (Abbildung 1.3). Die erste Sequenz (CX₄CX₄CX₃C) ist in allen 40 bekannten ABCE1 Homologen konserviert, die zweite Sequenz (CX₂CX₂CX₃C) in 36 ABCE1 Proteinen (Kerr, 2004). Sie haben hohe Sequenzähnlichkeit mit der vier Eisen - vier Schwefel [4Fe-4S]-Clustern Domäne von Ferredoxinen. Die Funktion einer Eisen-Schwefel-(FeS)-Cluster Domäne von ABCE1 ist jedoch nicht bekannt. FeS-Proteine findet man bei Eukaryoten in den Mitochondrien, im Zytosol und im Kern. Aufgrund der Redoxeigenschaften der FeS-Cluster liegt die Funktion oft in der Elektronenübertragung (<http://metallo.scripps.edu/promise/FESMAIN.html#FeS>). FeS-Cluster sind an nahezu allen wichtigen Redoxprozessen der belebten Welt beteiligt. Sie fungieren dabei sowohl als kleine lösliche Elektronenübertragungsproteine (Ferredoxine) als auch als Untereinheiten großer, z. T. membrangebundener, Proteinkomplexe. Schwefel kann formale Valenzen von -II bis +VI annehmen, liegt in FeS-Cluster allerdings immer als S²⁻ vor. Eisen liegt als Eisen +II und +III, sehr selten als Eisen +IV vor. Diese chemische Vielseitigkeit spiegelt sich in der Vielzahl der verschiedenen FeS-Verbindungen (Abbildung 1.7) und dadurch auch in der Bandbreite der Redoxpotentiale der FeS-Cluster von Proteinen wieder. FeS-Cluster, die an Elektronentransfer beteiligt sind können Fe(Cys)₄, [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S] oder [8Fe-8S] im aktiven Zentrum enthalten, wobei häufig Cysteine die tetraedische Schwefelkoordination vervollständigen (<http://metallo.scripps.edu/promise/FESMAIN.html#FeS>).

Eisen-Schwefel-Cluster übernehmen neben dem Elektronentransfer auch andere wichtige Funktionen. Aus vielen Beispielen ist bekannt, dass FeS-Cluster Tertiärstrukturen stabilisieren, bzw. destabilisieren, wenn sich die Zusammensetzung der Umgebung ändert. Deshalb ist es nicht überraschend, dass FeS-Cluster wichtige strukturelle und regulatorische Aufgaben erfüllen. Bei den DNA Reparaturenzymen MutY und der Endonuklease III hat der redoxinaktive [4Fe-4S]-Cluster, ähnlich wie Zink bei den Zink-Finger Proteinen, eine

ausschließlich strukturelle Bedeutung. Der Cluster kontrolliert bei diesen Proteinen die Struktur eines Proteinloops, der bei der Erkennung und Reparatur von geschädigter DNA eine Rolle spielt.

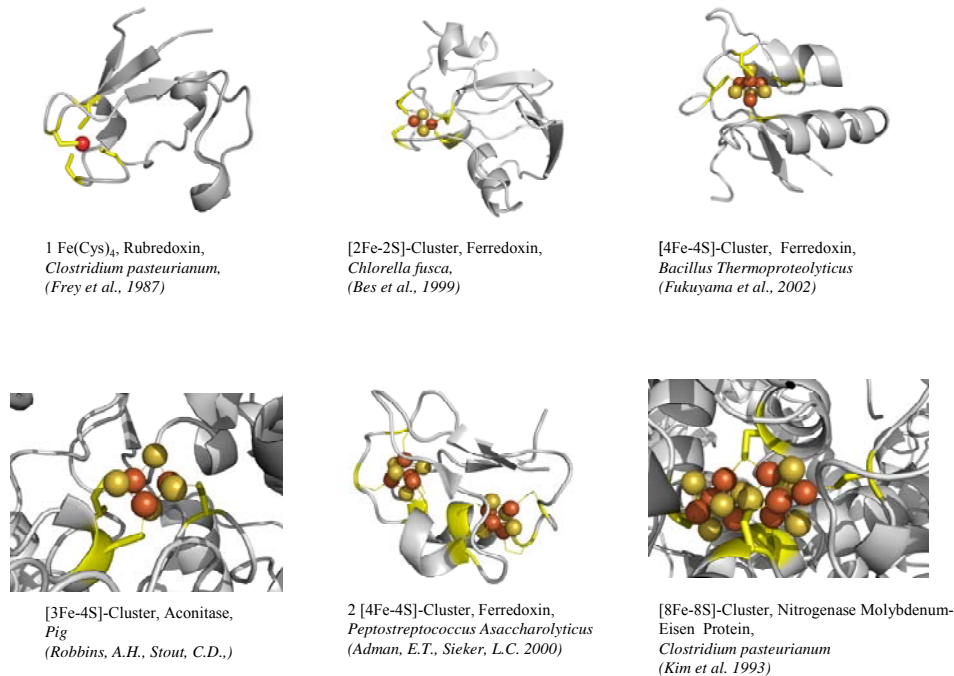


Abbildung 1.7 **Eisen-Schwefel-Cluster unterschiedlicher Zusammensetzung**
Eisenschwefelcluster können eine unterschiedliche Anzahl von Eisen und Schwefel-Ionen enthalten. Cysteine (gelbe Kugeln) übernehmen meistens die Koordination des Schwefels. Eisenionen sind orange dargestellt.

Bei vielen zentralen Prozessen haben FeS-Cluster katalytische Funktionen als Oxigenasen und Hydrogenasen (Bertini et al., 1995). Dehydrations- und Hydrationsreaktionen verlaufen über eine „noncysteinyll“ Ligation an einer besonderen Eisenbindungsstelle eines [4Fe-4S]-Clusters. Aconitase, die die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat im Zitronensäurezyklus katalysiert, ist das hierfür am besten beschriebene Beispiel. Auch bei der Regulation der Transkription und der Translation in Bakterien sind FeS-Proteine beteiligt. Diese Proteine reagieren empfindlich auf Umwelteinflüsse. Dabei ist die Clusterzusammensetzung, die Clusterumwandlung bzw. die Redoxchemie der Cluster wichtig für die Detektion. So reagiert z.B. das Protein SoxR aus *E. coli* auf oxidativen Stress mit der Oxidation von Eisen (II) zu Eisen (III) und stimuliert so die transkriptionale Expression von SoxS, welches wiederum die Transkription von Proteinen der oxidativen Stressantwort aktiviert. Eine Übersicht über die biologischen Funktionen von FeS-Clustern ist in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1 Übersicht über die biologischen Funktionen der verschiedenen Eisen-Schwefel-Cluster (Johnson et al., 2005)

Funktion	Beispiele	Cluster
Elektronen Transfer	Ferredoxin; Redox Enzyme	[2Fe-2S]; [3Fe-4S]; [4Fe-4S]
Gekoppelter Elektronen/ Protonen Transfer	Rieske Protein	[2Fe-2S]
	Nitrogenase	[8Fe-7S]
Substratbindung und Aktivierung	(De-) Hydratase	[4Fe-4S]
	Radikal SAM Enzyme	[4Fe-4S]
	Acetyl-CoA Synthase	Ni-Ni-[4Fe-4S]
	Sulfit Reduktase	[Ni-4Fe-5S] [4Fe-4S]-siroheme
Eisenspeicher	Ferredoxin;	[4Fe-4S]
	Polyferredoxin	[4Fe-4S]
Strukturelle Funktion	Endonuclease III	[4Fe-4S]
	MutY	[4Fe-4S]
Regulation der Genexpression	SoxR	[2Fe-2S]
	FNR	[4Fe-4S]/[2Fe-2S]
	IRP	[4Fe-4S]
	IscR	[2Fe-2S]
Regulation von Enzymaktivität	Glutamine PRPP Amidotransferase	[4Fe-4S]
	Ferrochelataase	[2Fe-2S]
Disulfidreduktion	Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase	[4Fe-4S]
	Heterodisulfide Reduktase	[4Fe-4S]
	Biotin Synthase	[2Fe-2S]

1.5 Die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese

In Bakterien gibt es drei separate Systeme für die Eisen-Schwefel (FeS) -Cluster-Biosynthese: das ISC („iron-sulfur-cluster“), das NIF („nitrogen fixation“) und das SUF („sulfur fixation“) System. Das mitochondriale ISC-System der Eukaryoten hat eine große Sequenzähnlichkeit mit dem bakteriellen ISC-System und ist nicht nur für die Assemblierung der mitochondrialen Eisen-Schwefel Proteine zuständig, sondern auch für die Biosynthese der zytosolischen und nukleären FeS-Proteine. Die Fertigstellung der extramitochondrialen Proteine ist sowohl von dem mitochondrialen ISC-Export System abhängig, als auch von dem zytosolischen Eisen-Schwefel-Assemblierungssystem („cytosolic iron-sulfur protein

assembly machinery“, CIA) (Lill and Muhlenhoff, 2005). Da ABCE1 ein cytoplasmatisches Protein ist, werden beide Systeme für die Assemblierung der beiden FeS-Cluster benötigt. Der Ausfall der Eisen-Schwefel-Assemblierung in Mitochondrien ist für eukaryotische Zellen schädlicher als Defekte in den besser bekannten mitochondrialen Funktionen wie die oxidative Phosphorylierung. Steht Hefe fermentierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung, können Gene der oxidativen Phosphorylierung ohne Konsequenzen ausgeschaltet werden (Grivell et al., 1999; Tzagoloff and Dieckmann, 1990). Selbst Säugetiere können lange ohne Atmungskette und ATP Produktion überleben. Mäuse ohne mitochondriale DNA haben in der Embryonalentwicklung 10,5 Tage überlebt, was dafür steht, dass die Atmungsabhängigkeit erst später in der Säugetierentwicklung entstanden ist (Larsson et al., 1998; Muhlenhoff and Lill, 2000). Bis heute ist deshalb die einzige bekannte essentielle Funktion der Mitochondrien die Assemblierung von Proteinen mit FeS-Cluster. Obwohl FeS Proteine eine Vielzahl von biologischen Funktionen erfüllen ist bislang nur ABCE1 als essentielles Protein gefunden worden. Somit stellt die Synthese von ABCE1 die bis dato einzig bekannte essentielle Funktion von Mitochondrien dar (Lill et al., 2005; Muhlenhoff and Lill, 2000).

1.6 Strukturbestimmung mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse

Bei Proteinen ist die Molekülstruktur eng mit der biologischen Funktion verknüpft. Die Kenntnis der dreidimensionalen Proteinstruktur führt deshalb in vielen Fällen zu einem besseren Verständnis der makromolekularen Eigenschaften. Die drei wichtigsten Techniken zur Erforschung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins sind die Röntgenkristallographie, die Elektronenmikroskopie (EM) und die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR).

Bei der Kristallstrukturanalyse mittels Beugung von Röntgenstrahlung wird die Verteilung der Elektronen in der Elementarzelle bestimmt, da diese mit der Röntgenstrahlung in Wechselwirkung treten. Das Ergebnis der Auswertungen ist eine Elektronendichtekarte. Da die Röntgenstrukturanalyse prinzipiell kein Limit in der Größe von Proteinen hat und hochaufgelöste Daten liefert, wurde diese Methode gewählt, um für ABCE1 genaue Informationen über die Proteinstruktur zu erhalten. Die Methoden der Röntgenkristallographie ist in einer Reihe von Lehrbüchern (Blow, 2002; Drenth, 1999; McPherson, 2002) ausführlich beschrieben, so dass hier nur auf einige grundlegenden

Prinzipien sowie auf die zur Strukturlösung von ABCE1 eingesetzten Methoden eingegangen wird.

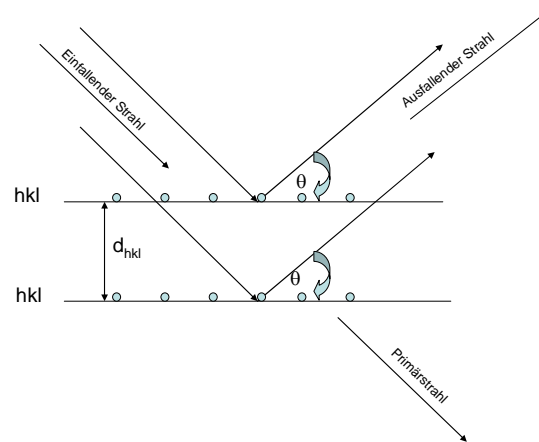
1.6.1 Proteinkristallisation

Die Röntgenstrukturanalyse benötigt Proteinkristalle. Die Herstellung dieser Kristalle ist oft schwierig und nicht vorhersagbar und in vielen Fällen der Engpass bei der Strukturaufklärung von Proteinen. Voraussetzung für die erfolgreiche Kristallisation ist zunächst einmal fast immer eine sehr reine Proteinlösung. Um von der gelösten Form des Proteins zur kristallinen zu gelangen, muss die Löslichkeit der Proteinmoleküle verringert werden. Der Kristallisationsvorgang hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab, wie z.B.: der Proteinkonzentration, der Temperatur, der Art und Konzentration des Fällungsmittels, der Ionenstärke, dem pH-Wert, sowie Pufferzusammensetzung und Additive. Die hohe Übersättigung der Proteinlösung führt in den meisten Fällen jedoch nicht zu Kristallkeimen, sondern zu einem amorphen Präzipitat, das gegenüber dem Kristallwachstum kinetisch im Vorteil ist. Um die Kristallisationsbedingungen jedes einzelnen Proteins zu finden ist es deshalb nötig alle Parameter zu variieren und mit Hilfe einer Testreihe die richtigen Parameter zu finden. Zum testen werden verschiedene Verfahren wie Dialyse, „Batch“-Methode oder die Dampfdiffusionsmethode angewendet. Die Dampfdiffusionsmethode ist dabei die am häufigsten verwendete Methode.

1.6.2 Entstehung von Reflexen

Im Proteinkristall werden die Elektronen der periodisch angeordneten Atome durch ein oszillierendes, elektromagnetisches Feld aus Röntgenstrahlen in Schwingung gebracht. Dadurch senden sie mit einer Phasenverschiebung Strahlung derselben Frequenz aus. Diese Strahlung entsteht an den Gitterebenen des Kristalls. Zwischen den von verschiedenen Atomen gestreuten Strahlen kann es zur Interferenz kommen, jedoch werden die Bedingungen für eine konstruktive Interferenz durch die kristalline Anordnung der Atome in Netzebenen sehr stark eingeschränkt. Positive Interferenz entsteht nur in diskreten Richtungen bei denen die Bragg'sche Gleichung erfüllt ist (Abbildung 1.8). Im Normalgitter eines Kristalls kann jede Gitterebene durch einen Vektor dargestellt werden, der senkrecht auf der Gitterebene steht und die Länge d_{hkl} hat. Die daraus resultierenden Gitterpunkte im reziproken Gitter werden mit den Millerschen Indizes h , k , l bezeichnet. Jeder dieser

Gitterpunkte hkl des reziproken Gitters entspricht einer Schar von parallelen Gitterebenen im realen Gitter. Der Abstand zwischen den Ebenen einer Ebenenschar im realen Gitter ist d_{hkl} . Man kann sich das Beugungsmuster so erklären, dass die Beugung an den (fiktiven) Miller'schen Ebenen hkl zustande kommt. Der Gangunterschied zweier paralleler Strahlen, die an Netzebenen mit dem Abstand d unter dem Glanzwinkel θ reflektiert werden, beträgt $2d\sin\theta$. Wenn dieser Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches ($n= 1, 2, 3, \dots$) der Wellenlänge λ beträgt, sind beide Strahlen „in Phase“ und es kommt zu einer konstruktiven Interferenz. Weil die Reflexion tatsächlich an vielen tausend Netzebenen stattfindet, führen schon sehr kleine Abweichungen vom Glanzwinkel dazu, dass die Strahlen sich gegenseitig auslöschen.



Bragg'sche Gleichung: $n\lambda = 2d\sin\theta$

Abbildung 1.8 **Entstehung von Interferenz**

Positive Interferenz entsteht nur in diskreten Richtungen. Wenn ein Bündel Röntgenstrahlen einer bestimmten Wellenlänge (λ) auf eine Netzebenenschar (hkl) mit dem Abstand d trifft, so kommt es nur unter ganz bestimmten Winkelbeziehungen (θ) zu einer konstruktiven Interferenz.

Durch die Bragg'sche Gleichung wird aber nur die Richtung der gebeugten Röntgenstrahlen angegeben, es wird keine Aussage über die Intensität der Reflexe gemacht. Neben der Position der Reflexe ist aber auch die Intensität messbar. Der Beugungswinkel und die Intensität des Reflexes werden gemessen und einer Netzebene im reziproken Raum des Kristallgitters zugeordnet, gekennzeichnet durch die Miller-Indizes h , k und l . Die Beugung führt zu scharfen Intensitätsmaxima.

1.6.3 Der Strukturfaktor und die Elektronendichte

Die Intensitäten der Reflexe werden durch den so genannten Strukturfaktor (F) bestimmt. Der Strukturfaktor ist abhängig von der Art und Verteilung der Atome in der Einheitszelle. Im Strukturfaktor steckt die gesamte Information über die Atompositionen in der Elementarzelle. Der Strukturfaktor berechnet sich aus der vektoriellen Summation der Teilwellen aller Streuzentren bei Reflexion an einer Ebenenschar hkl . Er ist somit eine Funktion aller Atomlagen in der Zelle: Zur Ermittlung des Strukturfaktors wird zunächst ein starres Gitter vorausgesetzt – also ohne Gitterschwingungen.

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

f_j = atomarer Streufaktor

h, k, l = Millersche Indizes

x_j, y_j, z_j = Koordinaten des Atoms j

Der atomare Streufaktor f_j ist proportional zur Kernladungszahl z und nimmt mit zunehmendem 2θ ab. Der Strukturfaktor F_{hkl} ist eine vektorielle, komplexe Größe aus einer Addition von N Wellen in Richtung hkl , die von j Atomen in der Elementarzelle gestreut werden.

Obwohl die Kristallstrukturanalyse eine Momentaufnahme eines biologischen Systems liefert, enthält sie dennoch Informationen über dynamische Vorgänge im Kristall in Form der sogenannten B -Faktoren. Sie sind ein Maß für die statistische Auslenkung oder statistische Unordnung eines Atoms, das um die angegebenen Koordinaten oszilliert. Damit ergibt sich für den Strukturfaktor:

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \exp[-B_j \sin^2 \theta / \lambda^2]$$

$\exp[-B_j \sin^2 \theta / \lambda^2]$ = Debye-Waller Faktor (B -Faktor)

Sowohl f_j als auch der Debye-Waller-Faktor steigen mit der Auflösung und erhöhen die Strukturfaktoramplitude. Der einzelne gebrochene Röntgenstrahl kann als periodische Fourier-Reihe beschrieben werden und ergibt aufsummiert über alle Reflexe den Strukturfaktor F_{hkl} . Die experimentelle Fourier-Transformation (reales Kristallgitter \leftrightarrow reziprokes Kristallgitter) wird durch eine mathematische Fourier-Transformation behandelt, bzw. das gemessene Beugungsmuster (h, k, l im reziproken Raum) wird durch eine inverse

Fouriertransformation in eine Elektronendichte im realen Raum transformiert.

<p>Elektronendichte</p> $\rho(x, y, z) = 1/V \sum_{hkl} F _{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\theta]$ <p>Realer Raum</p>	<p>Fourier $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ $\xleftarrow{\hspace{1cm}}$ Inverse Fourier</p>	<p>Strukturfaktor</p> $F_{hkl} = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x, y, z) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz$ <p>Reziproker Raum</p>
---	--	---

Die Elektronendichte in der Einheitszelle kann somit aus den Beträgen der Strukturfaktoren $|F|_{hkl}$ und der Phase θ_{hkl} berechnet werden.

Im Experiment wird die Intensität gemessen, die dem Quadrat der Strukturfaktoramplitude entspricht:

$$I_{hkl} = a |F_{hkl}|^2$$

$a = \text{konstant}$

In der Messung der Intensitäten ist aber keine Phaseninformation θ_{hkl} enthalten. Die Phaseninformation θ_{hkl} geht beim Diffraktionsexperiment verloren und muss auf andere Weise bestimmt werden.

1.6.4 Bestimmung der Phasen

Wie alle elektromagnetischen Wellen haben Röntgenstrahlen eine Amplitude f_j (atomarer Streufaktor) und eine Phase θ_i (die die Lage des Atoms in der Elementarzelle beschreibt). Um die Elektronendichte zu berechnen, werden beide Parameter, die Amplitude und die Phase benötigt. Um die Phasen zu erhalten gibt es verschiedene Methoden:

- Isomorphen Ersatz („Multiple isomorphous replacement“, MIR) durch Schwermetallderivate
- Molekularer Ersatz („molecular replacement“, MR) durch eine bekannte, ähnliche Struktur
- anomale Dispersion („single wavelength anomalous diffraction“, SAD und „multiwavelength anomalous diffraction“, MAD) durch anomale Streuer

Zur Berechnung der Phasen von ABCE1 wurden die Techniken SAD und MR verwendet.

1.6.5 Die Pattersonfunktion

Die Pattersonfunktion ist eine inverse Fouriertransformation von quadrierten Reflektionsamplituden (F_{hkl}^2). Diese Funktion ergibt keine Elektronendichtekarte, sondern eine Dichtekarte der Vektoren zwischen allen streuenden Objekten in der Einheitszelle. Die Pattersonfunktion ist eine Selbstfaltung der Elektronendichtefunktion und ist das Produkt von zwei Elektronendichten an verschiedenen Orten. In eine Fourierreihe eingesetzt ergibt dass die Pattersonfunktion P , wobei die Phasen θ gleich Null gesetzt wurden.

$$P(u,v,w) = \sum |F_{hkl}|^2 \exp[-2\pi i(hu + kv + lw)]$$

Da die Dichte der Pattersonkarte aus dem Quadrat der Anzahl der Elektronen des streuenden Objektes berechnet wird, dominieren die Vektoren zwischen Schweratomen. Die Anzahl der Peaks ist aber abhängig von dem Quadrat der Anzahl der Atome, so dass die Pattersonkarte von Proteinen kaum interpretierbar ist. Das heißt, $|F|^2$ kann nicht direkt als Koeffizienten der Fouriersumme für die Pattersonfunktion verwendet werden, die Protein-Protein-Vektoren ergeben einen zu hohen Hintergrund. Man versucht daher, den Proteinanteil abzuziehen (Patterson \rightarrow Differenzpatterson). Beim isomorphen Ersatz wird eine isomorphe Differenzpattersonkarte erstellt (z.B. die Differenz der Intensitäten zwischen einem nativen Kristall und einem Schwermetallderivat), bei einer anomalen Differenzpattersonkarte wird die Differenz der Intensitäten zwischen Bijvoet Paaren (siehe 1.6.7) verwendet. Mit Hilfe der Pattersonkarte lassen sich somit die Lagen der Schweratome bestimmen.

1.6.6 Direkte Methoden

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Lagen von Schweratomen oder anomalen (siehe 1.6.7) Streuern sind die direkten Methoden. Dabei werden folgende Voraussetzungen verwendet:

- Die Intensitäten besitzen auch die Phaseninformationen obwohl Phasen und Amplituden einer Welle zwei unabhängige Größen sind
- Die Elektronendichte ist immer positiv
- Die Atome und damit die Elektronendichten sind diskret im Raum verteilt.
- E-Werte: Strukturfaktoren, normalisiert für Punktatome wobei $|E|$ aus $|F|$ berechenbar ist; E hat die gleiche Phase wie F

- Zwischen den einzelnen Bragg'sche Reflexionen gibt es Phasenrelationen (Triplet relation)
- aus einem kleinen Phasen-Startsatz kann man weitere Phasen berechnen
- Die Fouriersynthese vom besten Phasensatz entspricht den Atompositionen

In der Praxis gilt das nur für sehr starke Reflexe, die deshalb stark sind, weil viele Atome in Phase reflektieren und deshalb auf denselben Gitterebenen liegen. Zur Berechnung wird die Sayre-Gleichung verwendet, in der gleiche, punktförmige Atome ohne Thermalbewegung vorausgesetzt werden

1.6.7 “Single Wavelength Anomalous Dispersion” (SAD) und “Multiple Wavelengths Anomalous Dispersion” (MAD)

Bei anomalen Dispersionsexperimenten wird die Streueigenschaft von Atomen verändert. Idealerweise verhalten sich die Elektronen wie freie Oszillatoren, die mit der Frequenz der einfallenden Strahlung oszillieren und Photonen derselben Frequenz emittieren. Das einfallende Photon besitzt nicht genug Energie um die Elektronen anzuregen und auf höhere Energieniveaus zu heben. Liegt die Energie des eintreffende Photons an der Absorptionskante eines Atoms, so werden neben der normalen Streuung auch einige Photonen absorbiert und bei einer geringeren Wellenlänge reemittiert (Fluoreszenz). Die absorbierte Strahlung wird mit einer veränderten Phase wieder abgegeben und verändert somit auch die Amplitude des Strukturfaktors. Dieses Phänomen wird anomale Streuung genannt und der anomale Streufaktor f_{anomal} wird zu einer komplexen Zahl (Abbildung 1.9). Die Änderung des realen Streubetrags, wird als dispersive Differenz bezeichnet.

$$f_{\text{anomal}} = f_0 + \Delta f + i f''$$

$$f' = f_0 + \Delta f$$

$$f_{\text{anomal}} = f' + i f''$$

f_0 ist der atomare Streufaktor, bei einer Wellenlänge weit entfernt von der Absorptionskante des Atoms. Δf ist der Anteil, um den f_0 an der Absorptionskante durch die anomale Streuung verändert wird. f'' ist der imaginäre Teil, der ein Maß für die anomale Streuung und die daraus resultierende Phasenverschiebung ist. f'' ist direkt proportional zum Absorptionskoeffizienten des anomalen Streuers und damit auch zu dessen Fluoreszenzspektrum und wird durch einen „Fluoreszenzscan“ ermittelt.

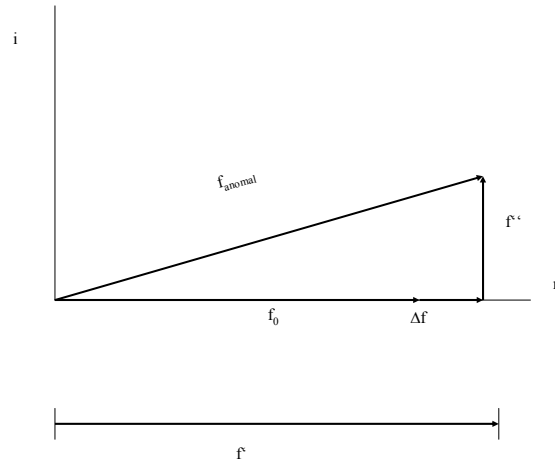


Abbildung 1.9 **Der atomare Streufaktor für ein gebundenes Elektron**

Der anomale Anteil f_{anomal} setzt sich aus zwei Anteilen, einem realen Teil f' und einem imaginären Teil if'' zusammen.

Wird der Absorptionskoeffizient für Röntgenstrahlung des Schweratoms gegen die Energie aufgetragen, ergibt sich eine Kurve mit einem sehr scharfen „Peak“, der der Absorptionskante entspricht. Die für MAD Phasierung verwendeten Wellenlängen entsprechen dabei dem Wendepunkt der Kurve („Inflection point“ (1)), dem Maximum der Absorptionskurve, (f'' Maximum, „Peak“ (2)) und einem Punkt weit entfernt von der Absorptionskante. Dabei lässt sich nur f'' genau bestimmen, aus f'' lässt sich mit Hilfe der Kramer-Kroenig Gleichung f' berechnen.

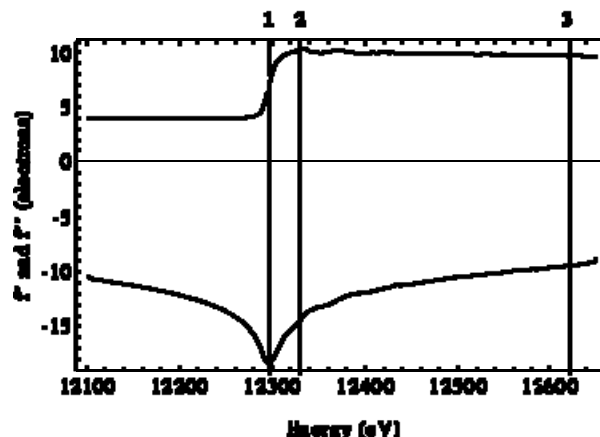


Abbildung 1.10 **Die drei Standardwellenlängen für ein MAD Experiment am Beispiel der Hg LIII Absorptionskante**

Um bei einem MAD Experiment die besten Phaseninformationen zu erhalten wird bei drei Wellenlängen gemessen. 1: „Inflection point“, 2: „peak“, 3: „Remote“

Übernommen von: http://www.embl-hamburg.de/display?file=~tucker/X31/X31_mad.html

Die anomale Streuung ist abhängig von der Wellenlänge und dem Atomtyp. Schwere Atome wie Selen, Kupfer oder Eisen haben aufgrund ihrer höheren Elektronenzahl eine stärkere anomale Streuung. Ihre Absorptionskanten liegen auch im Wellenlängenbereich der am Synchrotron erzeugbaren Röntgenstrahlung. Die Absorption von Röntgenstrahlung bei bestimmten Wellenlängen durch die Elektronenhülle schwerer Atome bewirkt, dass das Gesetz von Friedel nicht mehr gilt, demzufolge die Strukturfaktoramplituden der Reflexe mit den Indizes h,k,l und $-h,-k,-l$ gleich sind. Die absorbierte Strahlung wird mit einer veränderten Phase wieder abgegeben und verändert somit auch die Amplitude des Strukturfaktors.

$$F(hkl) \neq F(-h-k-l)$$

Die Bijvoet Differenz ist der Unterschied zwischen den gemessenen Strukturfaktoramplituden:

$$\Delta B_{ij} = |F_H(hkl)| - |F_H(-h-k-l)|$$

Es wird definiert:

$$\Delta F_{ano} = (|F_{PH}(hkl)| - |F_{PH}(-h-k-l)|) \times f'/2f'$$

Wobei:

$f'/2f'$ ein Normierungsfaktor ist.

F_H = Streuanteil des schweren Atoms

F_{PH} = Strukturfaktor vom Schwermetallderivat

F_P = Strukturfaktor des nativen Proteins

Eine Pattersonkarte, die mit $\Delta|F_{ano}|^2$ berechnet wird, sollte nur Peaks enthalten, die zu den Vektoren zwischen anomalen Streuern gehören. Damit können die Positionen der Schweratome bestimmt und somit die Phasen der Strukturfaktoren berechnet werden. Die so erhaltenen Phasen können zur Bestimmung der Phasen für das Protein verwendet werden. Da jetzt der Strukturfaktor des anomalen Streuers F_H und die Amplituden der Strukturfaktoren von F_{PH} und F_P bekannt sind lässt sich mit einer Fouriertransformation eine erste Elektronendichte berechnen.

1.6.8 Molekularer Ersatz

Beim Molekularen Ersatz muss ein Modell vorliegen, das Ähnlichkeit zu der gesuchten Struktur aufweist. Das Modell (bzw. dessen Patterson-Funktion, P_m) wird mit der Patterson-

Funktion (P_x) der zu lösenden Struktur überlagert. Die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoren $|F_{hkl}|_c$ werden mit den gemessenen Strukturfaktoren $|F_{hkl}|_o$ der unbekannten Struktur verglichen. Es werden zwei Faktoren optimiert:

1. Der R-Faktor wird minimiert. Das bedeutet, dass die kalkulierten Strukturfaktoren $|F_{hkl}|_c$ den beobachteten Strukturfaktoren $|F_{hkl}|_o$ sehr ähnlich sind.
2. Der Lineare Standard Korrelationskoeffizient C wird maximiert.

Gut brauchbare Werte sind z.B. wenn $R < 50\%$ und $C > 30\%$.

Die berechneten Phasen θ_c können dann mit den gemessenen Amplituden $|F|_o$ und den berechneten Amplituden $|F|_c$ zur Berechnung des Strukturfaktors und einer ersten Elektronendichte ($2F_o - F_c$) verwendet werden.

1.6.9 Verbesserung der Phasen

Oft sind die Phasen, die experimentell erhalten wurden, nicht gut genug, um eine interpretierbare Elektronendichte zu erhalten. Zusätzliche Informationen können helfen, die Phasen zu verbessern:

- nicht kristallographische Symmetrie („non-crystallographic symmetry“, NCS). Wenn sich mehr als ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet. Es wird zunächst davon ausgegangen, dass alle Moleküle mehr oder weniger strukturell identisch sind. Alle Moleküle der asymmetrischen Einheit werden dann unabhängig voneinander betrachtet und die Elektronendichten gemittelt.
- Lösungsmittelglättung („Solvent flattening“).
In der Umgebung des Proteins, in der nur Lösungsmittel vorliegt (35-80% der Einheitszelle) sollte die Elektronendichte sehr gering sein (Lösungsmittel ist ungeordnet). An diesen Stellen werden alle Gitterpunkte des Lösungsmittels auf einen konstanten Wert gesetzt. Außerdem sollte die Elektronendichte im Protein positiv sein, deshalb werden alle Gitterpunkte des Proteins positiv gesetzt.
- Charakteristische Frequenzverteilung der Elektronendichte
- Phasenkombinationen aus unterschiedlichen Phasenberechnungen (MIR-MIR, MIR-MAD)

1.6.10 Strukturverfeinerung

Ungenauigkeiten in den Reflexintensitäten und in den Phasenwinkeln sowie unvollständige Daten ergeben Fehler bei der Phasenbestimmung. Daher werden das Strukturmodell und die Dichte verfeinert. Die aus den gemessenen Daten bestimmten Strukturfaktoren F_o und Phasen θ_o (o = gemessen („observed“)) und die daraus berechnete Elektronendichte werden dazu verwendet, um ein erstes Atommodell in die Elektronendichte zu bauen. Daraus lassen sich Modellphasen θ_c (c = berechnet („calculated“)) berechnen. Mit diesen verbesserten Phasen kann dann wiederum eine neue, verbesserte Elektronendichte berechnet werden. Mehrere Verfeinerungszyklen helfen zu einer verbesserten Übereinstimmung von Modelldaten und Messdaten. Für die Verfeinerungszyklen werden zwei Elektronendichten berechnet:

- Die $2 F_o - F_c$ Dichte, die den systematischen Fehler ein F_o Dichte verringert,
- Die Differenzdichte $F_o - F_c$; die „positive“ bzw. „negative“ Dichten enthält, wenn F_o von F_c unterschiedlich ist.

F_o = observierter („observed“) Strukturfaktor

F_c = berechneter („calculated“) Strukturfaktor

Ein Maß für die Übereinstimmung zwischen Modell und den beobachteten Daten stellt der kristallographische R-Faktor dar:

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_o| - k|F_c||}{\sum_{hkl} |F_o|}$$

$|F_o|$ = beobachtete Strukturfaktoramplitude

$|F_c|$ = berechnete Strukturfaktoramplitude des Modells

k = Skalierungsfaktor

Für völlig zufällig verteilte Atome in der Einheitszelle einer nicht zentrosymmetrischen Struktur ist der R-Faktor 0,59. Bei Proteinstrukturen erreicht man R-Faktoren von 0,15–0,25 abhängig von der Auflösung. Daher gilt der R-Faktor als die relevante Richtgröße, die angibt, wie gut das Modell zu den Daten passt. Ziel ist es, den kristallographischen R-Faktor zu minimieren, wobei auch geometrische Parameter wie Stereochemie (Bindungslängen und Winkel) berücksichtigt werden (Engh and Huber, 1991). Ein zufällig ausgewählter Teil der Daten (5 % der Reflexe) wird von der Verfeinerung ausgeschlossen und zur Berechnung des freien R-Faktors genutzt (Brünger, 1992). Er beschreibt, wie gut das Modell die nicht zur Verfeinerung einbezogenen Daten voraussagt (Vergleichsprüfung). Der so berechnete freie

R-Faktor, oft 2- 5% höher als der kristallographische R-Faktor, warnt dabei vor einer Überanpassung des Atommodells an die Daten.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Struktur und die Funktion der ABC ATPase ABCE1 zu ermitteln. Obwohl in den letzten Jahren viele Funktionen von ABCE1 bekannt wurden, ist die genaue biologische Aufgabe weiterhin unklar. Die Struktur- und ATP-abhängigen biochemischen Vorgänge von ABC ATPasen wurden oft untersucht und sind von hoher medizinischer Relevanz aber die strukturellen Mechanismen der ABC Proteine werden noch nicht komplett verstanden. Bei allen ABC ATPasen sind die nukleotidbindenden Domänen (NBD) konserviert. ABCE1 enthält zwei unterschiedliche NBD, alle bisher bekannten Strukturen von ABC ATPasen enthalten dagegen nur eine NBD, die ATP abhängig dimerisieren können. Die beiden NBD von ABCE1 sind durch eine für ABC ATPasen einzigartige Domäne, die Scharnierregion, verbunden. Dadurch ist in ABCE1 die relative Position der beiden NBD zueinander festgelegt. Die Struktur von ABCE1 könnte deshalb wichtige Aufschlüsse über den für alle ABC ATPasen gemeinsamen Mechanismus der ATP-Bindung und -Hydrolyse geben.

Der N-Terminus von ABCE1 enthält zwei cysteinreiche Regionen, die hohe Ähnlichkeit mit der Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) Domäne von Ferredoxinen haben. Die Funktion dieser, bei allen ABCE1 Proteinen stark konservierten Regionen, ist jedoch nicht bekannt. Durch die aerobe Aufreinigung war es zunächst nicht möglich das komplette Protein zu kristallisieren, da es sich herausstellte, dass ABCE1 ein sauerstofflabiles Protein mit schlechten Kristallisationseigenschaften ist. Im ersten Teil der Arbeit sollten deshalb zunächst nur die beiden NBD mit der verbindenden Scharnierregion, ohne die N-terminale Domäne, kristallisiert und daraus die Struktur bestimmt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte mit Hilfe von biochemischen Methoden ein System zur stabilen Bereitstellung von ABCE1 für die Kristallisation aufgebaut werden. Da es sich herausstellte, dass die FeS-Cluster durch Luftsauerstoff oxidiert werden, war es notwendig, eine Methode zu etablieren, diese vor Oxidation zu schützen. Um ausreichende Mengen an ABCE1 zu erhalten, sollte ein effizientes Rekonstitutionssystem in einem anaeroben Zelt gefunden werden. Mit Hilfe eines Enzyms aus der bakteriellen FeS Biosynthese sollte ABCE1 in die native Konformation zurückgeführt werden. Aus dem stabilisierten, nativen Protein sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Struktur

ermittelt werden, um unter Verwendung des ermittelten Strukturmodells Aufschlüsse auf die möglichen biologischen Funktionen von ABCE1 zu erhalten.

Um die aus dem Strukturmodell erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, sollten konservierte bzw. strukturell wichtige Motive von ABCE1 in einer Kollaboration mit Birgit Märten, Genzentrum München, in *S. cerevisiae* mutiert werden. Ortsspezifische Mutagenesen sollte Hinweise auf die Funktion einzelner Aminosäuren geben und deren Auswirkung auf den Organismus *in vivo* zeigen.

Einige Archaeen, wie die in der Arbeit verwendeten, sind thermophile Organismen und das Temperaturoptimum ihrer Proteine liegt bei hohen Temperaturen ($>70^{\circ}\text{C}$). Biochemische Analysen sind bei diesen Temperaturen oft nicht durchführbar. Überexpression in *E. coli* ist bei eukaryotischen oder komplexeren Proteinen oft nicht möglich. Eine Methode, um große Mengen an löslichem ABCE1 Protein zu erhalten ist die Expression in Insektenzellen, die mit rekombinanten Baculoviren infiziert werden. Für biochemische Analysen und um ein eukaryotisches Homolog für die Kristallisation zu erhalten, sollte deshalb ABCE1 aus *S. cerevisiae* durch die Überexpression in Insektenzellen bereitgestellt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien hatten die Qualitätsstufe „zur Analyse“. (pro Analysis, p.A.) und wurden, falls nicht gesondert aufgeführt von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) bzw. Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Kristallisationlösungen und Werkzeuge wurden von Hampton Research (Aliso Viejo, USA), Nextal Biotechnologies (Montreal, Canada, jetzt Qiagen, Hilden) oder Jena Bioscience (Jena) bezogen.

3.2 Methoden der Molekularbiologie

Allgemeine Techniken wie Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktionsverdau von DNA zur Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen, alkalische Dephosphorylierung von DNA Enden, Vervielfältigung von Plasmid-DNA und Agarosegel-Elektrophorese wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook, 1989).

3.2.1 Isolierung von DNA

Genomische DNA aus Archaeobakterien wurde mit DNAzol® Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) nach der Anleitung des Herstellers präpariert. Plasmid DNA wurde mit NucleoSpin®-Plasmid Quick Pure Kit (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. DNA Fragmente wurden aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin®-Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) herausgereinigt.

3.2.2 Konzentration und Reinheit von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem UV/VIS Specord 200 der VEB Carl Zeiss Jena über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Einer Konzentration von 50µg/ml dsDNA entspricht hierbei einer 1 A_{260} (Sambrook, 1989). Der Quotient aus A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Bei vollkommen reiner dsDNA ist dieser Quotient = 2.

3.2.3 Klonierung

Die verwendeten Gene wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion aus dem entsprechenden Genom mit der ACCUZYME™ DNA Polymerase (Bioline, Luckenwalde) vervielfältigt, mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und in die benötigten Vektoren kloniert.

3.2.4 Restriktionsverdau

Enzyme, Puffer und Nukleotide für die Molekularbiologie wurden bei Fermentas (St-Leon-Rot) bezogen. Für den Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde die DNA mit dem gewünschten Enzym unter dem vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Mengenangaben mindestens 1h inkubiert. Zur Detektion der entstandenen DNA Fragmente wurde Agarose-Gelelektrophorese verwendet.

3.2.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden für PCR, Mutagenese und DNA Sequenzierung benötigt. Alle verwendeten Oligonukleotide waren von Thermo Electron Corporation (Ulm) oder Fa. MWG Biotech (Ebersberg) und HPLC gereinigt. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Primer und die damit vervielfältigten Produkte dargestellt, die für die Klonierungen verwendet wurden.

Tabelle 3.1: Verwendete Primer für ABCE1 Konstrukte aus verschiedenen Organismen

Konstrukt	Oligo Sequenz
<i>afu</i> ABCE1	af_rlin0 5'-AAAACATATGCCTTTCCGTATTGCAGTTGTGGACAGAGAACGC-3' af_rlic0rev 5'-AAAA GCGGCCGC TTA TCAGAAATAGTAGTAATACTCCCCAGC-3'
<i>pfu</i> ABCE1	<i>pfu</i> RLIN0.for 5'-TGGGGAGGGCATATGCGTATTGCGGTCATCGATTACGACAAATG-3' <i>pfu</i> RLIc0his.rev 5'-AAAAGCGGCCGCGCAATATAGTAGTATTACCTTTC-3' <i>pfu</i> RLIC0.rev 5'-AAAAGCGGCCGCCTATTAGGCAATATAGTAGTATTACCTTTC-3'
<i>pfu</i> ABCE1 Δ1-30	<i>pfu</i> RLIN1.for 5'-AAAAACATATGGGTGGTGAGGCAATAATTATTGACGAAGAAAAC-3' <i>pfu</i> RLIC0.rev
<i>pfu</i> ABCE1 N2 (Δ1-83)	<i>pfu</i> RLIN2 5'-AAAAACATATGGGTGTAAACGCCTTCGTCTCTA-3' <i>pfu</i> RLIC0.rev
<i>pfu</i> ABCE1 N1b (Δ1-	<i>pfu</i> RLIN1b.for

63)	5'-AAACATATGAAGGCCATAAGCATAGTTAACCTAC-3' <i>pfuRLIC0.rev</i> :
<i>pfu</i> ABCE1 N1C (Δ1-71 Katharina Büttner)	<i>pfuRLIN1c.for</i> : 5'-AGAGCAGCTCGAAGAGGACTGTGTGC-3' <i>pfuRLIC0.rev</i>
<i>pfu</i> FeS	<i>pfuRLIN0.for</i> FeSHIS.rev: 5'-AAA AGCGGC CGC TTC GAG CTG CTC TGG TAG GTT AAC-3' FeS.rev 5'-AAAAGCGGCCGCTCATTCGAGCTGCTCTGGTAGGTTAAC-3'
<i>pab</i> ABCE1	<i>pabRLI.for</i> 5'-AAAAACATATGGTGAGGAAAATGAGGATCGCG-3' <i>pabRLI.rev</i> 5'-TTTTTTGCGGCCGCGGCGTAGTAGTATTCTCCCTTGC-3'
<i>pab</i> ABCE1 ΔFeS	<i>pabRLId75.for</i> 5'-AAA CAT ATG CCA GAG CAA TTA GAT AAA GAT G-3' <i>pabRLI.rev</i>
<i>sso</i> ABCE1	<i>ssoRLIN0.for</i> : 5'-AAA CAT ATG CGT GTT GCT GTA ATA AAT TAT GAC TTT TGT AAG-3' <i>ssoRLI.rev</i> 5'-GTA AAG AAA TGT CCA TAC GAA GCT ATA TCA ATT G-3'
<i>sso</i> ABCE1 ΔFeS	<i>ssoRLId75.for</i> 5'-AAA CATATG CCA GAC GAG TTA GAA GGA GAG G-3' <i>ssoRLI.rev</i>
pET-28 N-Strep	N-Strep.for 5'-C ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCT CA-3' N-Strep.rev 5'-TATGAGCGCCTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGC-3'
pET-29 C-Strep	C-Strep.for 5'-G GCC GCG TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA-AAA TAA GC-3' C-Strep.rev 5'-CGC ACC TCG GTG GGC GTC AAG CTT TTT ATT CGACT-3'
Isc-S	ISC.for 5'-AAACAT ATGAAATTAC CGATTTATCT CGACTAC-3' ICS.rev 5'-AAAGCGGCCGCTTAATGATGAGCCCATTCGATGCTG-3'
<i>Methanosarcina</i>	Mesaro.for: 5'-AAA CATATG CCA GAC GAG TTA GAA GGA GAG G-3' Mesaro.rev: 5'-AAAGCGGCCGCTCACTCCTTAGCAGAATAATAATAG-3'
<i>Methanosarcina</i> ΔFeS	Mesarod75: 5'-AAA CAT ATG CCT GAA GCC CTG CAG GAA CC-3' Mesaro.rev: 5'-AAAGCGGCCGCTCACTCCTTAGCAGAATAATAATAG-3'
<i>Human</i> ABCE1	hrlin0 5'-AAA ACAT ATG GCAGACAAGT TAACGAGAAT TG-3' hrlic0hrev 5'-AAAA GCGGCCGC ATCATCCAAGAAAAAGTAGTTTCCAC-3' hrlic0rev 5'-AAAA GCGGCCGC TTA CTA ATCATCCAAGAAAAAGTAGTTTCCAC-3'
<i>Human</i> ABCE1 ΔFeS	hRLId74.for 5'-AAA CAT ATG CCG AGC AAC TTG GAA AAA GAA ACC AC-3' hrlic0hrev hrlic0rev
<i>Yeast</i> ABCE1	yRLIN0.for 5'-AAACATATGAGTGATA AAAACAGTCG TATCGCTATC-3'

	yRLIco.rev 5'-AAAGCGGCCGCTTAAATACCGGTGTTATCCAAGAAAAAG-3' yRLIc0His.rev 5'-AAAGCGGCCGCAATACCGGTGTTATCCAAGAAAAAG-3'
<i>Yeast</i> ABCE1 ΔFeS	yRLId76.for 5'-AAA CAT ATG CCG ACT AAT TTA GAA GCC CAT GTA ACT C-3' yRLIco.rev yRLIc0Hios.rev

3.2.6 Oligonukleotide zur DNA Sequenzierung

DNA wurde von Medigenomix (Martinsried) sequenziert. Folgende Oligonukleotide zur Sequenzierung wurden dazu verwendet:

T7 Promotor : 5'-AATACGACTCACTATATAGGG-3'
T7 Terminator: 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCGG-3'
T7 Terminator II: 5'- CAAAAAACCCTCAAGACCCG-3'

3.2.7 Mutanten von ABCE1

Zusätzlich zu den N-terminal verkürzten Konstrukten wurden ausgewählte Aminosäuren mutiert. Punktmutationen wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion („PCR-based site-directed mutagenesis“) (Ho et al., 1989) eingebracht. Komplementäre Oligos, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten wurden in einer ersten PCR verwendet, dabei wurden zwei Produkte mit überlappenden Enden amplifiziert. Diese DNA Produkte wurden in einer zweiten PCR verwendet, wobei die Überhänge zusammengefügt und dann der komplementäre Strang 3' verlängert wurde. Um das gesamte Gen zu amplifizieren, wurden die flankierenden Primer ebenfalls in dem Reaktionsansatz zugefügt. Tabelle 3.2 enthält eine Zusammenstellung der mutierten Aminosäuren. Einige Mutanten wurden von K. Buettner (Buettner, 2003) hergestellt.

Tabelle 3.2 Zusammenstellung der erstellten Mutanten und ihre Lage in konservierten Bereichen

Organismus	Mutante	Teil des Strukturmotivs
<i>pab</i> ABCE1	R304E E240Q E483Q K443A Y244F Y244F-E483Q E240Q-Y244F E240Q-Y244F-E483Q S216A D274N R304K-K443A	Hinge I Walker B I Walker B II Strukturell divers D-Loop D-Loop + Walker B II Walker B I + D-Loop D-Loop + Walker B I + II Signatur Motiv I His-Switch (Buettner, 2003) Hinge I, Strukturell divers (Buettner, 2003)
<i>pab</i> ABCE1 Δ FeS	Y244F Y244F-E483Q E240Q-Y244F-E483Q S216A	D-Loop D-Loop +Walker B II D-Loop + Walker B I+ II Signatur Motif I
<i>pfu</i> ABCE1 Δ FeS	E236Q E479Q E236Q-E479Q	Walker B I (Buettner, 2003) Walker B II (Buettner, 2003) Walker B I+II (Buettner, 2003)
<i>sso</i> ABCE1 Δ FeS	S234R S481R S234R-S481R	Signatur I Signatur II Signatur I+ II

3.2.8 Plasmide

3.2.8.1 Kommerziell verfügbare Plasmide

Zur Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* wurden pET- Vektoren der Firma Novagen, Schwalbach/Ts und pTyB Vektoren von New England Biolabs (Frankfurt/Main) verwendet. Als Transfervektor zur Klonierung der rekombinanten Proteine für die Expression in Insektenzellen wurden der Vektor pFastBac1 von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Die Selektion erfolgte über die vektorspezifischen Resistenzen durch Zugabe der entsprechenden Selektionsmarker zu dem Wachstumsmedium.

3.2.8.2 Modifizierte Plasmide mit Strep-tag

Die Plasmide pET-28 N-Strep und pET-29 C-Strep sind modifizierte pET-Vektoren (Novagen, Schwalbach/Ts). Bei der Modifikation wurden die in den Plasmiden pET-29 bzw. pET-28 codierenden Regionen für den N-terminalen 6xHis-tag (pET-28) bzw. den C-terminalen 6xHis-tag (pET-29) durch einen N-terminalen (pET-28 N-Strep) bzw. C-terminalen (pET-29 C-Strep) Strep-tag II ersetzt.

pET-28 N-Strep

Die Oligonukleotide N-Strep.for und N-Strep.rev. sind komplementär und kodieren für einen kurzen Linker (Aminosäuren MAS), der die Sequenz für das Strep-tag II Peptid (Aminosäuren: WSHPQFEK) und einem Linker zum Protein (GAH) enthält. Durch den Strep-tag II kann ein Protein über Affinitätschromatografie durch Bindung an Strep-Tactin gereinigt werden, durch den Linker wurde eine bessere Zugänglichkeit des Strep-tags II für das StrepTactin erreicht.

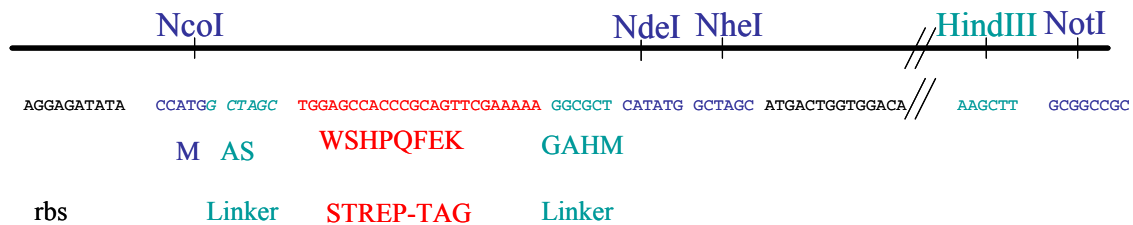


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des codierenden Bereichs für den Strep-tag von pET-28 N-Strep
 Ein dsDNA Fragment konnte über die Restriktionsseiten NcoI und NdeI in pET-28 gesetzt werden (oben). Ausschnitt aus Basensequenz, Aminosäuresequenz und Restriktionsseiten von pET-28 N-Strep (unten)

Um ein doppelsträngiges DNA-Fragment zu erhalten wurden 100 µM beider Oligonukleotide auf 100°C erhitzt und zum Zusammenfügen langsam abgekühlt. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass nach dem Zusammenfügen am 5'-Ende ein CCATG Überhang (für NcoI) am codierenden Strang und am 3' Ende ein GTAT Überhang (für NdeI) am Gegenstrang entstanden ist. Mit Hilfe dieser „sticky-ends“ konnte das dsDNA-Fragment in einen mit NcoI und NdeI geschnittenen Vektor pET-28 gesetzt werden.

pET-29 C-Strep

Die Oligonukleotide C-Strep.for und C-Strep.rev. sind komplementär und kodieren für das Strep-tag II Peptid (Aminosäuren: WSHPQFEK), für einen kurzen Linker (Aminosäuren AA), und dem Stop-Codon. Der zwei Aminosäuren des Linkers vergrößern den Abstand zwischen dem Protein und des des Strep-tag II. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass nach dem annealen am 5'-Ende ein GGCCGC Überhang (für NotI) am codierenden Strang und am 3' Ende ein CGAGT Überhang (für Bpu1102I) am Gegenstrang entstanden ist. Um ein doppelsträngiges DNA-Fragment zu erhalten wurden 10 µM beider Oligonukleotide auf 100°C erhitzt und zum Zusammenfügen langsam abgekühlt. Mit Hilfe der „sticky-ends“ konnte das zusammengefügte DNA-Fragment in einen mit NotI und Bpu1102I geschnittenen Vektor pET-29 gesetzt werden.

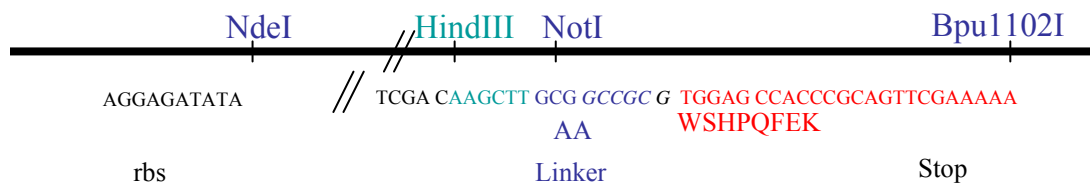


Abbildung 3.1 **Schematische Darstellung des codierenden Bereichs für den Strep-tag von pET-29C-Strep**
 Ein dsDNA Fragment konnte über die Restriktionsseiten NotI und Bpu1102I in pET-29 gesetzt werden (oben). Ausschnitt aus Basensequenz, Aminosäuresequenz und Restriktionsseiten von pET-29 C-Strep (unten).

3.2.9 ABCE1 wurde aus verschiedenen Organismen kloniert

Tabelle 3.3 enthält eine Zusammenstellung aus welchen Organismen ABCE1 hergestellt wurde, die verwendeten Vektoren, Tags die die Reinigung über Affinitätschromatografie ermöglichten und die zum integrieren des ABCE1 Gens verwendeten Restriktionsseiten. Sämtliche Mutanten, die sich vom Wildtyp nur in einer oder wenigen Aminosäuren unterscheiden sind in der Tabelle nicht mit aufgeführt.

Tabelle 3.3 Klonierungs und Reinigungsstrategie von ABCE1 aus den unterschiedlichen Organismen

Konstrukt	Vektor	Tag	Restriktionsseiten
<i>afu</i> ABCE1	pET-21 pET-21 pET-28	His (C-Term) Ohne His (N-Term)	NdeI, NotI
<i>pfu</i> ABCE1	pET-21 pET-28 pET-21 pET-29 pET-28 N-Step pET-29C-Strep pTYB1 pTYB12	His (C-Term) His (N-Term) ohne ohne Strep-tag (N-Term) Strep-tag (C-Term) Intein Tag (C-Term) Intein Tag (N-Term)	NdeI, NotI NdeI, XhoI NdeI, NotI
<i>pfu</i> ABCE1 N1 Δ 1-30	pET-28	His (N-Term)	NdeI, Not
<i>pfu</i> ABCE1 N2 Δ 1-83	pET-28	His (N-Term)	NdeI, Not
<i>pfu</i> ABCE1 N1b Δ 1-63	pET-28	His (N-Term)	NdeI, Not
<i>pfu</i> ABCE1 N1c Δ 1-71	pET-28	His (N-Term)	NdeI, NotI
<i>pfu</i> FeS	pET-21 pET-28	Ohne N His	NdeI, NotI
<i>pab</i> ABCE1	pET-28 pET-29 pET-29 pET-28 N-Step pET-29C-Strep pTyp12	His (N-Term) His (C-Term) Ohne Strep-tag (N-Term) Strep-tag (C-Term) Intein Tag (N-Term))	NdeI, NotI
<i>pab</i> ABCE1 Δ FeS	pET-28 pET-29 pET-29	His (N-Term) His (C-Term) Ohne	NdeI, Not
<i>sso</i> ABCE1	pET-29 pET-28 N-Step pET-29C-Strep GST-pET-29	His C Strep-tag (N-Term) Strep-tag (C-Term) GST-tag	NdeI, NotI VspI, EcoRI
<i>sso</i> ABCE1 Δ FeS	pET-28 pET-29	His (N-Term) ohne	NdeI, NotI
<i>Human</i> ABCE1	pET-28	His (N-Term) His (C-Term) Ohne	NdeI, NotI
<i>Human</i> ABCE1 Δ FeS	pET-28 pET-29 pET-29	His (N-Term) His (C-Term) Ohne	NdeI, NotI
<i>S. cerevisiae</i> ABCE1	pET-28 pET-29 pET-29 pET-28N-Strep pFastBac1	His (N-Term) His (C-Term) Ohne Strep-tag (N-Term) Strep-tag (N-Term)	NdeI, NotI StuI
<i>S. cerevisiae</i> ABCE1 Δ FeS	pET-28 pET-29 pET-29	His (N-Term) His (C-Term) Ohne	NdeI, NotI
pET-28-N-Strep	pET-28	Strep-tag (N-Term)	NcoI, NdeI
pET-29-C-Strep	pET-29	Strep-tag (C-Term)	NotI, Bpu1102I
Isc-S	pET-29	ohne	NdeI, NotI
<i>Methanosarcina</i>	pET-28	His (N-Term)	NdeI, NotI
<i>Methanosarcina</i> d75	pET-28	His (N-Term)	NdeI, NotI

3.3 Methoden der Mikrobiologie

3.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Vervielfältigung klonierter Plasmid DNA wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, La Jolla/CA (USA)) verwendet. Rekombinante Bacmid DNA wurde mit DH10Bac (Invitrogen) hergestellt. Zur Proteinexpression wurden die *E. coli* Stämme Rosetta (DE3) (Novagen, Schwalbach/Ts) und BL21Codon Plus (DE3)-RIL (Stratagene, Jolla/CA (USA)) verwendet. Selenomethionin konnte mit Hilfe des methioninautotrophen *E. coli* Stamm B834 (DE3) (Novagen, Schwalbach/Ts) in Proteine inkorporiert werden.

Tabelle 3.4: *Bakterienstämme, die zur Klonierung und Expression von ABCE1 verwendet wurden*

Stamm	Genotyp	Firma
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene, La Jolla/CA (USA)
Rosetta (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE (Cm ^R)	Novagen, Schwalbach/Ts.
B834 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm met (DE3)	Novagen, Schwalbach/Ts.
BL21Codon Plus(DE3)-RIL	B F- ompT hsdS (r _B - m _B -) dcm+ Tetr gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr], Extra Kopien von argU, ileY und leuW tRNA Genen auf einem ColE1-kompatiblen Plasmid (Cm ^R)	Strata gene, Jolla/CA (USA)
DH10Bac	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG /pMON14272 / pMON7124	Invitrogen

3.3.2 Insektenzellen

Die Sf21-Zellen (Invitrogen) entstammen dem Ovariumgewebe der Puppe des Heerwurmes *Spodoptera frugiperda* Smith (einer Schmetterlingsraupe). Sie besitzen eine Verdopplungsdauer von 18 bis 24 Stunden und wachsen sowohl in Monolayer als auch in Suspensionskultur. Die in dieser Arbeit verwendeten Sf21-Zellen sehen im Lichtmikroskop gleichmäßig kugelförmig aus, haben unterschiedliche Größen und heften sich innerhalb von 10 Minuten an den Boden von Zellkulturflaschen.

3.3.3 Medien

3.3.3.1 Medien für Bakterien

Luria Bertani (LB) Medium (Miller, 1972)

Bacto- Tryptone	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0.5% (w/v)
NaCl	0.5% (w/v)
pH 7,0	

1,5 -2 % Bacto-Agar wurden für die Herstellung von LB- Platten verwendet.

Minimal Medium für Inkorporation von Selenomethionin

Das LeMaster's Medium enthält folgende Komponenten (Le Master, 1985):

1. Autoklavierbare Bestandteile(in g/2l):

Aminosäuren:

Alanine	1,0	Isoleucin	0,46
Arginine Hydrochlorid	1,16	Lysin Hydrochlorid	0,84
Asparaginsäure	0,8	Phenylalanin	0,2666
Cystein	0,066	Prolin	0,2
Glutaminsäure	1,5	Serin	4,166
Glutamin	0,66	Threonin	0,46
Glycin	1,08	Tyrosin	0,34
Histidin	0,12	Valin	0,46
Leucin	0,46		
Adenosin	1,0	Thymin	0,34
Guanosin	1,34	Uracil	1,0
Natriumacetat	3,0	Succinic acid	3,0
Ammoniumchlorid	1,5	Natriumhydroxid	1,7
Kaliumdihydrogenphosphat	21,0		

Alle Aminosäure sind die L-Enantiomere und wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und die gefilterten nicht autoklavierbaren Bestandteile (10:1) hinzugefügt.

2. Nicht-autoklavierbare Bestandteile (Gramm pro 20 ml)

Glucose, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,0	Magnesiumsulfat 0,5	
Eisensulfat	8,4	Schwefelsäure (konz)	16 μl
Thiamin	10,0		

3. Selenomethionin

Selenomethionin (Calbiochem, Schwalbach/Ts.) wurde direkt vor der Expression in sterilem Wasser gelöst (100mg/2200ml), und dem Medium zugefügt.

3.3.3.2 Medium für Insektenzellen

Für die Insektenzellen wurde folgendes Medium verwendet:

Zu HyQ SFX-Insect MP (Hyclone, Perbio) für 5l steriles Wasser wurde 0,35 g/l Natriumdihydrogencarbonat und 1,5 ml/l Glycerin hinzugefügt. Der pH der Lösung wurde mit Natronlauge auf 6,1-6,4 eingestellt, anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

3.3.4 Konzentrationen von Antibiotika und IPTG

Antibiotika wurden als Stocklösungen (SL) in den angegebenen Konzentrationen hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Ampicillin:	SL: 100 mg/ml in H_2O ;	Endkonzentration 100 $\mu\text{g/l}$
Kanamycin	SL: 50 mg/ml in H_2O ;	Endkonzentration 50 $\mu\text{g/l}$
Chloramphenicol	SL: 50 mg/ml in Ethanol;	Endkonzentration 50 $\mu\text{g/l}$
Tetracyclin	SL: 10mg/ml in Ethanol,	Endkonzentration 10 $\mu\text{g/ml}$
Gentamicin	SL: 50mg/ml,	Endkonzentration 7 $\mu\text{g/ml}$
X-gal	SL: 100mg/ml,	Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$
IPTG:	SL: 1 M in H_2O	Endkonzentration 0.5 mM

3.3.5 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) hergestellt und in 100 μl Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Transformation wurden ca. 50 ng einer Ligationreaktion bzw. 1 ng Plasmid-DNA zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschritt bei 42°C für 45-60 Sekunden und kurzer Abkühlung auf Eis (ca.

2 Minuten) wurden die Zellen 45-60 Minuten bei 37°C in 1ml LB inkubiert, auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.3.6 Markierung mit Selenomethionin

Um für kristallographische Experimente Methionin durch Selenomethionin im Protein zu substituieren, wurde der methionauxotrophe *E. coli* Stamm B834 (DE3) verwendet. Dazu wurden die Zellen in einer Übernachtskultur mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C angezogen, abzentrifugiert und die Hauptkultur in LeMaster's Medium mit ca. 2 Vol% aus der Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD von 0,4-0,6 wachsen gelassen, auf 18°C abgekühlt und die Proteinexpression mit der Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Selenomethionin enthaltendes Protein wurde über Nacht bei 18°C exprimiert. Zur Reinigung wurde zusätzlich zu den angegebenen Puffer 2 mM DTT hinzugefügt.

3.3.7 Herstellung der Baculovirus-DNA

Rekombinate Baculovirus DNA wurde mit dem BAC-TO-BAC-System (Invitrogen) hergestellt. Dazu wurde der pFastBac-1 Vektor benötigt, in den die DNA für das zu exprimierende Protein kloniert wurde. Der *E. coli* Stamm DH10BAC, der die Baculovirus-DNA als „Expressionskassette“ (Bacmid) enthält, wurde mit dem pFastBac Vektor transformiert (1 ng Plasmid-DNA/100 µl Bakteriensuspension). Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden unterzogen und anschließend für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurde je 900 µl SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und die Kultur für 4 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden verschiedene Volumina (zwischen 10 und 100 µl) auf Agarplatten (5 µg/l Tetracyclin, 5 µg/l Kanamycin, 7 µg/l Gentamycin, 100 µg/l X-Gal) ausplattiert. DH10BAC-*E. coli* enthalten ein Helferplasmid, dessen Genprodukte zur Transposition der DNA aus dem pFastBac Vektor in die Bacmid-DNA notwendig sind. Die Inkubation der Platten bei 37°C erfolgte so lange, bis blaue Kolonien gut von weißen Kolonien unterscheidbar waren (2-3 Tage). Die Bakterienkolonien, die das rekombinante Bacmid enthielten, wurden durch die Unterbrechung des lacZ-Gens

über eine Blau-Weiß-Selektion identifiziert. Die ausgewählten Kolonien wurden präpariert und die DNA zur Transfektion von Sf21-Zellen eingesetzt.

3.4 Methoden der Proteinbiochemie

Physikalische und chemische Parameter wie Molekulargewicht, theoretischer isoelektrischer Punkt und Extinktionskoeffizient wurden mit ProtParam (Gasteiger E., 2005)) des ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org>) berechnet. Homologe Sequenzen wurden mit den NCBI BLAST und PSI BLAST-Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gefunden. Sequenzalignments wurden mit ClustalW (<http://align.genome.jp>) erstellt und in Genedoc (Nicholas, 1997) und Word editiert.

3.4.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die archaealen ABCE1 Proteine wurden in *E. coli* rekombinant löslich überexprimiert. Dafür wurden *E. coli* BL21 Codon Plus DE3 RIL (Stratagene) bzw. Rosetta DE3 mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und auf LB-Agar mit dem Selektionsmarker ausplattiert. Aus einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur mit den erforderlichen Antibiotika versetzt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Expression wurde LB Medium mit den erforderlichen Antibiotika mit 2% der Vorkultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ 0,4-0,6 bei 37°C inkubiert. Um die Ausbeute an löslichem, rekombinantem Protein zu erhöhen, wurden die Kulturen auf 18°C abgekühlt und bei 18°C gehalten. Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, anschließend wurde über Nacht bei 18°C unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation konnten die Zellen vom Medium getrennt (5000 g, SLS6000 Rotor bei 4 °C) und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden. Um Selenomethionin-markiertes Protein herzustellen wurde der methioninauxotrophe *E. coli* Stamm B834 (DE3) (Stratagene) mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Die Bakterien wurden in 100 ml LB Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker bei 37°C in einer Übernachtskultur inkubiert. 2200 ml Le Masters Medium, angereichert mit Selenomethionin und Ampicillin, wurden mit 2% der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD 600 von 0,5 inkubiert. Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach Inkubation bei 37°C für 3 h und Zentrifugation wurden die

Zellen bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.2 Proteinexpression in Insektenzellen durch rekombinante

Baculoviren

Proteinexpression in Insektenzellen wurde nach der Anleitung des Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expressions System von Invitrogen durchgeführt. In einer 6 well Kulturplatte ($V = 7\text{cm}^2$) wurden 5×10^5 Zellen in 2 ml Medium angeimpft und bei 27°C inkubiert. Nach dem Ausbilden eines Zellrasens (ca. 0,5 h), wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und 10 µl Cellfectin (Invitrogen) mit 15 bzw. 25 µl Bacmid DNA in 2 ml frischem Medium zu den Zellen pipettiert. Nach 5 h Inkubation bei 27°C wurde das Medium gegen 2 ml Medium mit 7 µg/ml Gentamycin ausgetauscht. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit Medium gespült und bei 500 rpm. für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Virus. Für die Proteinexpression wurden in einem 75 cm²-Schüttelkolben etwa 5×10^5 Zellen/ml für 1 h bei 27 °C inkubiert und dann mit der Viruslösung versetzt. Es wurde ein Virus:Zell Verhältnis von etwa 10:1 durch Zugabe der entsprechenden Menge der Viruslösung (persönliche Mitteilung Dr. Cui Sheng) eingestellt. Dazu wurde 2 ml Medium mit Baculovirus hinzugefügt. Nach Expression über 3 Tage bei 27 °C wurde die Zellkultur in sterile Zentrifugenbecher überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 100 µM PMSF, 5 mM DTT) aufgenommen. Mit Hilfe von Ultraschall, in 3x10 Zyklen mit 50 % Leistung, wurden die Zellen unter ständiger Eiskühlung aufgeschlossen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt enthielt der Überstand das lösliche exprimierte Protein.

3.5. Proteinreinigung

3.5.1 Verwendete Puffer

Tabelle 3.5 Liste der zur Proteinreinigung verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Aufluspuffer: - Konstrukte mit 6xHis-tag - Konstrukte mit Strep-tag	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0, 200 mM NaCl, 100 µM PMSF 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 100 µM PMSF,
Ni-NTA	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 bis 300 mM Imidazol
Strep-Tactin	20 mM TRIS/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0 and 2,5 mM Desthiobiotin
Anionenaustauscher	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM bis 1 M NaCl
Kationenaustauscher	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 50 mM bis 1 M NaCl
Mono-P	20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM bis 1 M NaCl
Gelfiltration	20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 5% Glycerin
Western-Plot (PBS)	140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 2 mM KH ₂ PO ₄

Bei allen Konstrukten, die die N-terminal Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne enthielten, sowie Proteine mit inkorporierten Selenomethionin, wurde den Puffern unmittelbar vor Gebrauch 2 mM DTT hinzugefügt.

3.5.2 Zellaufschluss und Hitzeschritt

Nach dem Auftauen wurden die Zellpellets aus *E. coli* und Insektenzellen in Lysepuffer resuspendiert. Zellaufschluß erfolgte mit Ultraschall im Eisbad. Durch Zentrifugation konnten unlösliche Zellbestandteile von löslichen Bestandteilen und ABCE1 abgetrennt wurden (15.000 g, 30 Minuten, bei 4 °C). Das Pellet wurde verworfen, der Überstand mit dem gewünschten Protein zur Weiterverarbeitung verwendet. ABCE1 Proteine aus thermophilen Archaeobakterien, konnten in einem ersten Reinigungsschritt durch Hitzedenaturierung (10 Minuten, 65°C) und anschließender Zentrifugation (20 Minuten, 15000 g) von einem Teil der temperaturinstabilen, endogenen *E. coli* Proteine getrennt werden. Zur weiteren Reinigung wurde bei Konstrukten mit einem 6xHis-Affinitätstag eine Ni-NTA Affinitätschromatografie verwendet. Konstrukte ohne 6xHis-tag und mit Strep-tag wurden direkt über Ionenaustauschchromatografie weiter gereinigt.

3.5.3 Ni-NTA Affinitätschromatografie

Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) - Chromatografie ist eine immobilisierte Metall-Chelat-Affinitätschromatografie (IMAC), bei der Proteine mit einem Hexahistidin-tag an komplexierte Ni^{2+} -Ionen gebunden werden. Dazu wurde der Überstand des Hitzeschrittes auf eine Ni-NTA (QIAGEN, Hilden) Säule aufgetragen. Um eine bessere Reinigung zu erzielen, wurde das an der Säule immobilisierte Protein zusätzlich mit 5 Säulenvolumen eines Puffers, der 10 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Der zur Proteinelution verwendete Puffer enthielt 300 mM Imidazol. Eluiertes Protein wurde fraktioniert gesammelt und konnte anschließend durch SDS-PAGE analysiert werden. Fraktionen die ABCE1 enthielten, wurden zur weiteren Verwendung vereinigt.

3.5.4 Ionenaustauschchromatografie

Für die Ionenaustauschchromatografie war es nötig, die Ionenkonzentration zu erniedrigen. Dazu wurde der Puffer mit dem Protein verdünnt, so dass eine Ionenendkonzentration von 50 mM vorlag. Bei der Ionenaustauschchromatografie mussten, da ABCE1 Proteine aus unterschiedlichen Organismen verschiedene isoelektrische Punkte haben, unterschiedlich weiter gereinigt werden. Bei ABCE1 Proteinen aus *Sulfolobus solfataricus* (*sso*) liegt der isoelektrische Punkt über 8, diese Proteine haben auch erwartungsgemäß an einen Kationenaustauscher (HighTrapSp Amersham Bioscience, Freiburg) gebunden und ließen sich so weiter aufreinigen. Für Proteinkonstrukte aus *Sulfolobus solfataricus* wurden die Puffer deshalb mit verdünnter Salzsäure auf einen pH von 6,8 eingestellt. Die ABCE1 Proteine aus *Pyrococcus abyssi* (*pab*) und *Pyrococcus furiosus* (*pfu*) besitzen einen isoelektrischen Punkt von ca. 6 und konnten über Anionenaustauschchromatografie (HighTrapQ Amersham Bioscience, Freiburg) bei pH 8,0 gereinigt werden. Proteinelution erfolgte bei allen Konstrukten mit einem linearen Salzgradienten über 10 Säulenvolumen von 50 mM NaCl bis 1 M NaCl. Die Bestimmung der Protein enthaltenden Fraktionen erfolgte über einen integrierten UV-Monitor und über SDS-PAGE.

3.5.5 Strep-tag Affinitätschromatografie

Das Strep-tag Reinigungssystem ist eine spezielle Affinitätschromatografie für die Reinigung von rekombinanten Proteinen, die zusätzlich ein aus den acht Aminosäuren WSHPQFEK bestehendes Peptid (Strep-tag II) enthalten. Der Strep-tag besitzt die hoch selektive und leicht kontrollierbare Fähigkeit mit einer Streptavidin Mutante (Strep-Tactin) zu interagieren. Das rekombinate Protein mit dem Strep-tag bindet während einer Affinitätschromatografie an immobilisiertes Strep-Tactin (IBA, Göttingen). Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgt mit Desthiobiotin, einem Biotinderivat. Desthiobiotin bindet im Gegensatz zu Biotin reversibel an Strep-Tactin, dadurch kann das immobilisierte Strep-Tactin mehrmals verwendet werden. In den Zellen enthaltenes Biotin verhindert die Bindung des rekombinanten Strep-tag Proteins an Strep-Tactin. Um das Biotin zu entfernen wurde die Strep-tag Affinitätschromatografie im Anschluss an eine Ionenaustauschchromatografie durchgeführt,

3.5.6 Gelfiltrationschromatografie

Um mögliche Aggregate und restliche Verunreinigungen zu entfernen, erfolgte als letzter Reinigungsschritt bei allen ABCE1 Proteinen eine Gelfiltrationschromatografie. Dazu wurde die Proteinlösung mit dem gereinigten Protein auf ein Volumen 1-3 ml reduziert und auf die Gelfiltrationssäule HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR (Amersham, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit einem zur Kristallisation geeigneten Puffer equilibriert. Die Bestimmung der proteinenthaltenden Fraktionen erfolgte über einen integrierten UV-Monitor und über SDS-PAGE.

Alle Proteine konnten bis zur Homogenität gereinigt werden. Ausgehend von 12 Litern Kulturmedium lag die Ausbeute bei 50–100 mg gereinigtem Protein.

3.5.7 Zusammenfassung der verwendeten Chromatografieschritte

Tabelle 3.6 enthält eine Zusammenfassung der verwendeten Chromatografieschritte.

Das Reinigungsprotokoll der ABCE1 Proteinmutanten entsprach immer dem Protokoll des jeweiligen Wildtypproteins.

Tabelle 3.6 *ABCE1 Proteine aus den verschiedenen Organismen und die zur Reinigung verwendeten Chromatografieschritte.*

Protein	Verwendete Chromatografieschritte
<i>afu</i> ABCE1	1. Ni-NTA Affinitätschromatografie 2. Mono-P 3. Gelfiltration HiPrep 16/60 Sephacryl S200
<i>pfu</i> ABCE1 <i>pfu</i> ABCE1 N1, Δ1-30 <i>pfu</i> ABCE1 N1b, Δ1-63 <i>pfu</i> ABCE1 N1c, Δ1-71 <i>pfu</i> ABCE1 N2, Δ1-83	1. Ni-NTA Affinitätschromatografie 2. Anionenaustauscher (HighTrapSp Amersham Bioscience, Freiburg) 3. Gelfiltration HiPrep 16/60 Sephacryl S200
<i>pab</i> ABCE1 <i>pab</i> ABCE1 ΔFeS	1. Ni-NTA Affinitätschromatografie 2. Anionenaustauscher (HighTrapSp Amersham Bioscience, Freiburg) 3. Gelfiltration HiPrep 16/60 Sephacryl S200
<i>pab</i> ABCE1 mit Strep-tag	1. Anionenaustauscher (HighTrapSp Amersham Bioscience, Freiburg) 2. Strep-Tactin Affinitätschromatografie 3. Gelfiltration HiPrep 16/60 Sephacryl S200
<i>sso</i> ABCE1 <i>sso</i> ABCE1 ΔFeS	1. Ni-NTA Affinitätschromatografie 2. Kationenionenaustauscher (HighTrapQ Amersham Bioscience, Freiburg) 3. Gelfiltration HiPrep 16/60 Sephacryl S200

3.6. Partielle Proteolyse

Bei dem gezielten enzymatischen Proteinverdau (partielle Proteolyse) wurde ABCE1 für kurze Zeit mit der Protease Trypsin inkubiert. Trypsin schneidet nur an spezifischen Stellen in flexiblen Bereichen von Proteinen, dadurch werden die Proteine zu definierten Fragmenten abgebaut. Die verwendeten Proteinlösungen wurden mit einer 1 M Tris/ HCl, pH = 8, so verdünnt, dass eine Pufferkonzentration von 100 mM vorlag. Zu jeweils 65 µg des gereinigten Proteins wurden 0,75 µg der Protease Trypsin hinzugefügt. Um die ATP abhängige Proteolyse zu testen wurde zusätzlich bei einem Teil der Ansätze ATP (5 mM) und Magnesium (10 mM) hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C inkubiert und nach 0, 1, 10 und 60 Minuten wurden Proben entnommen. Durch Zugabe von 10 mM PMSF, SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C wurde die Proteolyse zu den angegebenen Zeitpunkten abgebrochen. Alle Proben wurden mit SDS-PAGE analysiert.

3.7 Proteinanalyse

3.7.1 SDS-PAGE

Proteinproben wurden durch Glyzin SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970)) in einem vertikalen Mini-PROTEAN 3 System (Bio-Rad, München) analysiert. Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) gefärbt.

3.7.2 Absorptionsspektrum

Absorptionsspektren zur Analytik von Protein- Lösungen wurden mit dem Specord 200 der VEB Carl Zeiss Jena aufgenommen. Der zur Berechnung von Proteinkonzentrationen verwendete Extinktionskoeffizient wurde mit dem Expasy-ProtParam tool (Gasteiger E., 2005)) berechnet.

3.7.3 Western-Blot

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Vor dem eigentlichen Western Plot wurde ein Proteingemisch mit Hilfe von SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Dazu wurde die Membran zweimal für jeweils 15 Minuten mit 2,5 g Milchpulver in 50 ml PBS, 0,1%Tween inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit einer verdünnten Antikörper-Lösung behandelt, wobei die Antikörper spezifisch gegen das ABCE1 aus *S. cerevisiae* auf der Membran gerichtet waren (Antikörper von der Arbeitsgruppe Jansen 1:3000 in 10 ml Blockpuffer verdünnt). Inkubation erfolgte 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C. Um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen wurde 3x mit PBS, 0,1% Tween für jeweils 15 Minuten gewaschen. Eine zweite Antikörperlösung (1µl Anti-Goat Sekundär-Antikörper in 10 ml PBS, 0,1% Tween, 0,5 g Milchpulver) wurde für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur zur Membran gegeben. Anschließend wurde 3x mit PBS, 0,1% Tween für 15 Minuten bei

Raumtemperatur gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit Autoradiographie auf Röntgenfilmen mit je 200 ml einer 1:1 verdünnten ECL (Amersham, Freiburg) Lösung. Das Amersham Biosciences ECL („enhanced chemiluminescence“) „Western Blotting“ System ist eine chemiluminescente, nicht-radioaktive Methode, die mit Hilfe von Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugierte Sekundärantikörper detektiert und mit einem chemilumineszenten Substrat, Luminol, ein Signal erzeugt, dass auf Röntgenfilm visualisiert werden kann.

3.8 Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster

Das Protein ABCE1 enthält am N-Terminus eine Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne mit zwei 4-Eisen-4-Schwefel-Clustern ([4Fe-4S]). Diese [4Fe-4S]-Cluster werden durch Luftsauerstoff zum Teil oxidiert und/oder zersetzt. Zur Rekonstitution der zwei Eisen-Schwefel-Cluster, wurde das bis zur Homogenität gereinigte, konzentrierte Protein nach dem letzten Reinigungsschritt in ein anaerobes Zelt („Glove box“) (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) überführt. Um unter anaeroben Bedingungen zu arbeiten (0-5 „parts per million“ (ppm) Sauerstoff) ist die „Glove box“ mit Formiergas gefüllt (95% Stickstoff, 5% Wasserstoff). Kleine Mengen an eindringendem Sauerstoff reagieren an Palladium Katalysatoren mit Wasserstoff zu Wasser.

Um die Proteinlösung sauerstofffrei zu bekommen, wurde der Puffer über eine Gelfiltrationssäule (Econo-Pac® 10DG desalting columns, Bio-Rad, München) mit einem in der „Glove box“ inkubierten Puffer (50 mM Tris/ HCl, pH = 8.0; 150 mM NaCl, 2 mM DTT) ausgetauscht. Zur Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster wurden pro 1 ml ABCE1 Proteinlösung (Konzentration 1 mg/ml) Bestandteile, wie in Tabelle 3.7 aufgeführt ist, hinzugefügt:

Tabelle 3.7: Für die Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster verwendete Chemikalien und Proteine.

Volumen in µl	Name	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
5	DTT	1 M	5 mM
10	Pyridoxalphosphat	20 mM	200 µM
20	L-Cystein	100 mM	2 mM
20	FeCl ₂	100 mM	2 mM
6	ISCS	3µg/µl	Insgesamt 18 µg

Der Rekonstitutionsansatz wurde über Nacht bei 4-8°C in der anaeroben „Glove box“ inkubiert und anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Econo-Pac® 10DG desalting columns, Bio-Rad, München) mit 50 mM Tris/ HCl, pH = 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT gereinigt. Die tiefbraune Lösung wurde auf eine Konzentration von 15 mg/ml konzentriert und sofort weiterverwendet.

3.9 Kristallisation

Alle zur Kristallisation verwendeten Proteine wurden wie beschrieben bis zur Homogenität gereinigt und auf eine Konzentration von 10-20 mg/ml konzentriert. Für die Kristallisation wurde die Dampfdiffusionsmethode (sitzender Tropfen) verwendet. Um die geeigneten Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden fertige Kristallisationsscreens von Hampton Research (Aliso Viejo, USA), Jena Bioscience (Jena) bzw. Nextal (Montreal, Kanada, jetzt Qiagen, Hilden) verwendet. Jeweils 1 µl der Proteinlösungen wurde mit derselben Menge einer Präzipitationslösung versetzt und in einem abgeschlossenen Raum in „96-Well“ Kristallisationsplatten von Corning (Schiphol-Rijk, Niederlande) gegen 100 µl der Präzipitationslösung equilibriert. Die Kristallisationsansätze wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops nach 24 h, 3-4 Tagen, 1 Woche und mehreren Wochen auf entstandene Kristalle untersucht. Erhaltene Kristalle wurden in Nylonloops der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, USA) geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.10 Datensammlung, Strukturbestimmung, Modellbau und Verfeinerung

Alle Daten wurden an der Beamline PX der Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) oder an der Beamline ID 29 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, Frankreich gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mit DENZO und SCALEPACK aus der HKL Suite (Ottwinowski and Minor, 1996) oder XDS (Kabsch, 1993) ausgewertet. Die Positionen der Schwermetallatome wurden mit SOLVE (Terwilliger, 2002) gefunden und die Phasen mit SHARP (De la Fortelle, 1997) ermittelt. Erste Phasen wurden mit SOLOMON (Abrahams and Leslie, 1996) verbessert. Molekularer Ersatz wurde unter Verwendung des angegebenen Suchmodels mit MOLREP, CNS 1.1 (Brunger et al.,

1998) oder AMoRe ((Navaza, 1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography) berechnet. Modellbau erfolgte mit automatisierten Resolve/ Refmac Zyklen (Terwilliger, 2002). Manuelle Verfeinerung des Models erfolgte mit MAIN (Turk, 1992). Nach anisotroper B-Faktor Verfeinerung und „bulk solvent“ Korrekturen wurde das Proteinmodell durch Zyklen von CNS (Brunger et al., 1998) und manuellem Modellbau in MAIN (Turk, 1992) verbessert. Lösungsmittel wurden mit CNS (Brunger et al., 1998) hinzugefügt. Für die Vergleichsprüfung wurden 5% der Reflexe verwendet, die bei der Verfeinerung nicht verwendet wurden. Koordinaten, Topologie und Parameter Files der Heterokomponenten wurden vom HIC-Up Server (Kleywegt and Jones, 1997) bezogen. Die Stereochemie des fertigen Proteinmodels wurde mit PROCHECK (Laskowski R. A., 1993) analysiert.

4. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Strukturaufklärung der ATP binding cassette (ABC) ATPase ABCE1. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur der ABCE1 Proteine aus *Pyrococcus abyssi* (*pab*), *Pyrococcus furiosus* (*pfu*) und *Sulfolobus solfataricus* (*sso*) bestimmt. Dabei konnte zuerst die Struktur der beiden ABC ATPase Domänen ohne die N-terminale Eisen-Schwefel-Cluster Domäne ermittelt werden. Im weiteren Verlauf der Doktorarbeit ist es dann gelungen, das gesamte Protein aus *Pyrococcus abyssi* zu kristallisieren und dessen Struktur zu bestimmen. Dafür war es notwendig, ein System zur anaeroben Rekonstitution der sauerstoffsensitiven N-terminalen Eisen-Schwefel-Cluster Domäne zu etablieren.

4.1 Klonierung und Reinigung von ABCE1 aus *Pyrococcus furiosus* und aus *Archaeoglobus fulgidus*

Mit Hilfe von PCR konnten die kodierenden Sequenzen von ABCE1 aus genomischer DNA von *Pyrococcus furiosus* (*pfu*) und *Archaeoglobus fulgidus* (*afu*) amplifiziert und in pET21 kloniert werden. Die Proteine wurden mit einem C-terminalen 6xHis-tag (Novagen) exprimiert.

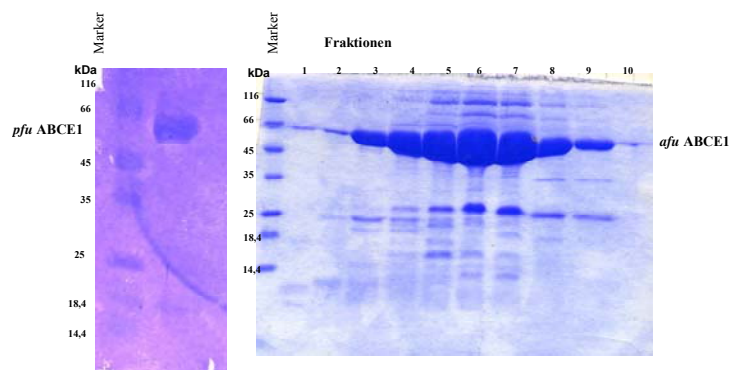


Abbildung 4.1 **SDS PAGE gefärbt mit Coomassie von *pfu* und *afu* ABCE1**
Gereinigtes *pfu* ABCE1 nach der Gelfiltration S200 und Fraktionen mit *afu* ABCE1 nach Ni-NTA Affinitätschromatografie.

Die Proteinexpression erfolgte in einem *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL Stamm in jeweils 12l LB-Medium. Um die Ausbeute an löslichem Protein zu erhöhen, wurde die

Temperatur vor Induktion mit IPTG auf 18°C gesenkt. Expression erfolgte über Nacht, dadurch konnten gute Proteinausbeuten erreicht werden. Nach dem Zellaufschluss wurde *pfu* ABCE1 über Ni-NTA, HighTrapQ und S200 bis zur Homogenität gereinigt. ABCE1 aus *Archaeoglobus fulgidus* wurde nach Proteinexpression und Zellaufschluss über Ni-NTA, Mono-P und S200 gereinigt (siehe Abbildung 4.1). Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden beide Proteine jeweils auf 10 mg/ml konzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Proteine konnten mit und ohne Zusatz von ATP nicht kristallisiert werden.

4.2 Proteolytischer Verdau von ABCE1 aus *Pyrococcus furiosus* und *Archaeoglobus fulgidus*

Um auf flexible Regionen zu testen, die eine Kristallisation verhindern könnten, wurden die beiden Proteine *pfu* ABCE1 und *afu* ABCE1 unter nativen Bedingungen (partielle Proteolyse) mit Trypsin inkubiert. Um zusätzlich zu testen, ob sich die Eigenschaften des Proteins bezüglich Zugänglichkeit für Proteasen durch ATP verändern, wurde der Verdau zusätzlich in Anwesenheit von ATP durchgeführt.

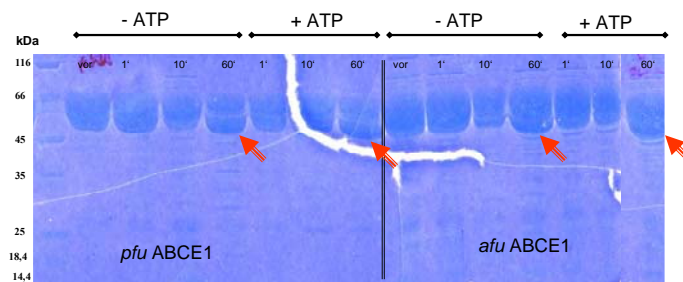


Abbildung 4.2 *Proteolytischer Verdau von pfu ABCE1 und afu ABCE1*

Die Proteine *pfu* ABCE1 und *afu* ABCE1 wurden jeweils mit und ohne ATP mit der Protease Trypsin inkubiert. Nach jeweils 1', 10' und 60' wurden Aliquots zur Analyse entnommen. Die mit einem roten Pfeil gekennzeichneten Banden entsprechen neu entstandenen, stabilen Fragmenten.

Bei Inkubation mit Trypsin konnte bei beiden Proteinen ATP-unabhängig eine weitere Proteinbande identifiziert werden, die auch nach 60' Inkubationszeit stabil blieb (Abbildung 4.2).

4.3 Klonierung und Reinigung der ABC ATPase Domänen von ABCE1 aus *Pyrococcus furiosus*

Aufgrund der Ergebnisse aus der partiellen Proteolyse wurden zwei neuen Proteinkonstrukte kloniert, die sich in der Länge des N-Terminus unterschieden (Abbildung 4.3).

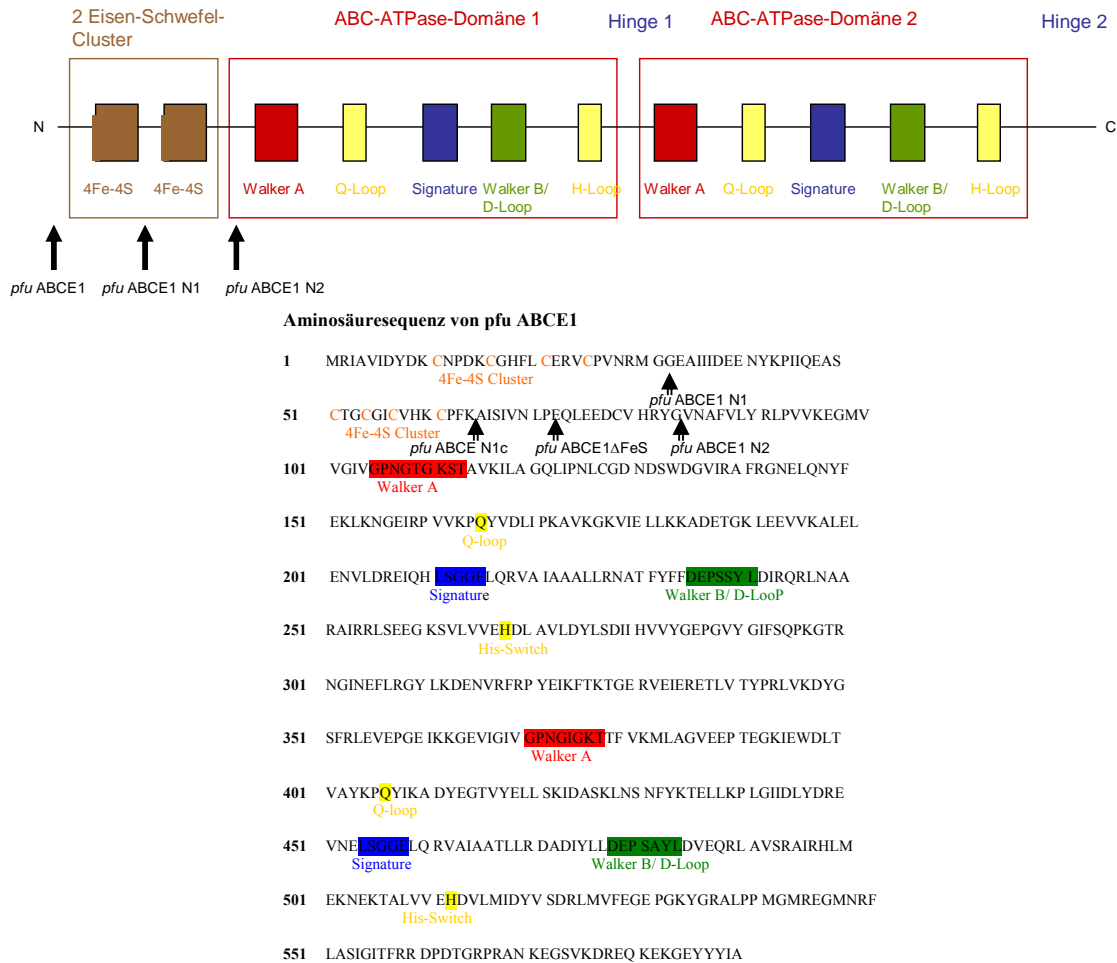


Abbildung 4.3 Die neuen N-Termini von pfu ABCE1 beginnen innerhalb und nach der Eisen-Schwefel-Cluster Domäne
 Die obere Abbildung zeigt, dass das Konstrukt pfu ABCE1 N1 innerhalb der Eisen-Schwefel-Cluster Domäne beginnt, während pfu ABCE1 N2 so gewählt wurde, dass es nach der Eisen-Schwefel-Cluster Domäne beginnt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz von pfu ABCE1 mit den konservierten Motiven. Die neuen N-Termini von pfu ABCE1 sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Bei einem Konstrukt liegt der neue N-Terminus innerhalb des Eisen-Schwefel-Cluster Domäne (pfu ABCE1 N1, Aminosäure 1-30 fehlen), bei einem zweiten

Konstrukt wurde die N-terminale Eisen-Schwefel-Cluster Domäne komplett deletiert (*pfu* ABCE1 N2, Aminosäuren 1-83 fehlen). Die so gewählten Konstrukte enthielten aber weiterhin die beiden Nukleotidbindungsdomänen (NBD) von ABCE1. Mit Hilfe der PCR wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen für ABCE1 aus genomischer DNA von *Pyrococcus furiosus* amplifiziert und in den Vektor pET28 kloniert. Die Proteine wurden mit einem N-terminalen 6xHis-tag (Novagen) exprimiert und konnten über Ni-NTA, Anionenaustauscher und Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt werden.

4.4 Kristallisation der ABC ATPase Domänen von ABCE1 aus *Pyrococcus furiosus* (*pfu*)

Zur Kristallisation wurden jeweils 2 µl des gereinigten Proteins (10 mg/ml in 20 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 5% Glycerin) mit jeweils 2 µl der Präzipitationslösung aus kommerziellen Screens zu einem Tropfen gemischt und bei Raumtemperatur mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode (sitzender Tropfen) langsam konzentriert. Von dem Proteinkonstrukt *pfu* ABCE1 N1 wurden keine Kristalle erhalten. Bei *pfu* ABCE1 N2 konnten nach einigen Wochen Kristalle in der Bedingung #38 des Hampton Cryo Screens beobachtet werden (Abbildung 4.4). Die Bedingung, die zur Proteinkristallisation führte enthielt folgende Bestandteile:

- 0.09 M HEPES-Na pH 7.5
- 1.26 M tri-Natriumcitrat dehydrat
- 5% v/v Glycerin



Abbildung 4.4 **Proteinkristalle von *pfu* ABCE1 N2 und Beugungsbild eines *pfu* ABCE1 N2 Kristalls**
Ein nativer Datensatz wurde an der „Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) gesammelt.

pfu ABCE1 N2 kristallisierte in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellkonstanten $a=70,29 \text{ \AA}$, $b=101,67 \text{ \AA}$, $c=188,27 \text{ \AA}$. Die asymmetrische Einheit enthielt zwei Moleküle. Ein nativer Datensatz wurde an der „Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) bis zu einer Auflösung von $1,9 \text{ \AA}$ gesammelt. Die aus dem nativen Datensatz erhaltenen Messwerte wurden anschließend zur Verfeinerung der Struktur mit Hilfe der aus einem SAD-Datensatz (Kapitel 4.5) gewonnenen Phasen verwendet.

4.5 Kristallisation und Strukturbestimmung der Selenomethionin substituierten ABC ATPase Domänen aus *Pyrococcus furiosus*

Zur Phasenbestimmung mittels anomaler Dispersion wurde ein SAD Experiment an einem Kristall des N-terminal verkürzten Konstruktes *pfu* ABCE1 N2 durchgeführt. Dazu musste die Aminosäure Methionin des Proteins durch Selenomethionin substituiert werden. Das Protein mit dem inkorporierten Selenomethionin wurde wie das native Protein kristallisiert (Konzentration = 10 mg/ml in 20 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 5% Glycerin). Kristalle konnten, wie bei dem nativen Protein, erst nach einigen Wochen beobachtet werden. Das Selenomethionin substituierte Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellkonstanten $a=67,95 \text{ \AA}$, $b=100,86 \text{ \AA}$, $c=186,23 \text{ \AA}$, mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit (siehe Tabelle 4.1). Ein anomaler Datensatz bis $2,5 \text{ \AA}$ Auflösung wurde an der „Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) gesammelt. Zur Auswertung der Bilder ($0,5^\circ$ Drehung pro Bild) wurde die HKL 2000 Programmfolge (Otwinowski and Minor, 1997) verwendet. Mit Hilfe des Programmes SOLVE (Terwilliger, 2002) konnten 15 der 16 Selenomethionine (jeweils 8 pro Molekül) gefunden und daraus erste Phasen mit SHARP (La Fortelle and Bricogne) berechnet werden. Nach einer Lösungsmittelglättung („Solvent flattening“) zum Verbessern der Phasen mit SOLOMON (Abrahams and Leslie, 1996), konnte eine verbesserte Elektronendichte erhalten werden. 80% der Polypeptidkette konnte mit Hilfe von alternierenden Resolve/ Refmac Zyklen automatisch ein erstes Modell gebaut werden (Terwilliger, 2002); (Abbildung 4.5). Fehlende Regionen des Modells wurden manuell mit MAIN (Turk, 1992) hinzugefügt. Nach anisotroper B-Faktor Verfeinerung und „bulk solvent“ Korrekturen wurde das Proteinmodell durch Zyklen von CNS 1.1. (Brunger et al., 1998) und manuellen Modellbau in MAIN (Turk, 1992) verbessert. Lösungsmittel wurde mit CNS (Brunger et al., 1998) hinzugefügt. Für die

Vergleichsprüfung wurden 5% der Reflexe hinzugezogen, die zur Verfeinerung nicht verwendet wurden. Werte der Datensammlung und Modellstatistiken sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

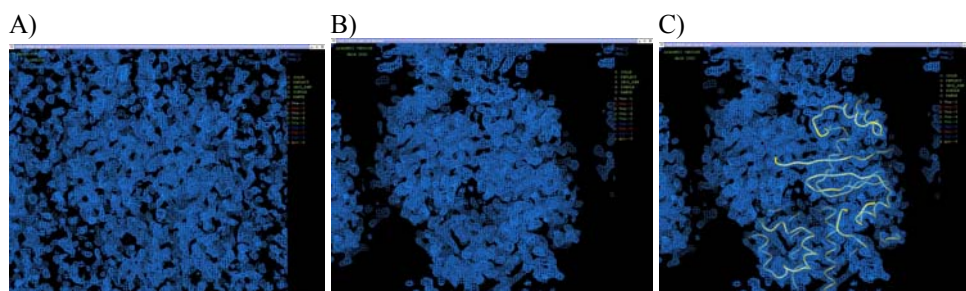


Abbildung 4.5 **Elektronendichten von pfu ABCE1 N2**

(A) Erste Elektronendichte nach der Berechnung von Phasen mit SHARP.

(B) Verbesserte Elektronendichte nach einer Lösungsmittelglättung („Solvent flattening“) mit SOLOMON.

(C) C α -Kette, die mit Hilfe von Resolve/ Refmake Zyklen in das Modell eingebaut wurde.

Das Proteinmodell enthielt 508 Aminosäurereste (Glycin 84 bis Alanin 590, dem nativen C-Terminus), ein Mg²⁺-Ion, ein ADP sowie 769 Wassermoleküle. Die gesamte Hauptkette sowie die Seitenketten waren eindeutig in der Elektronendichtekarte definiert. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit Procheck (Laskowski R. A., 1993) überprüft. Die Analyse der ϕ , Ψ -Dihedralenwinkel nach Ramachandran (Ramachandran, 1963) zeigten eine gute Stereochemie. 91,6% der Werte waren in der bevorzugten, 8,2% in der erlaubten und 0,0% waren in der verbotenen Region.

Tabelle 4.1 **Werte der Datensammlung und Modellstatistiken von pfu ABCE1 N2**

Kristallografische Datensammlung und Analyse	
Kristallografische Daten	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle (Å)	a=77,95, b=100,87, c=186,23, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Röntgenstrahlungsquelle	PX
Wellenlänge	0,9330
Auflösung (Å)	30-1,9
Beobachtete Reflexe	249.322 (44.451)
Vollständigkeit ^a (%) (letzte Schale)	96,7 (99,6)
R _{sym} ^b (letzte Schale)	0,054 (0,383)
I/ σ I letzte Schale	2,7

Verfeinerung	
Auflösungsbereich (Å)	25–1,9
Reflexe $F > 0$ (Crossvalidierung)	99221 (5279)
Lösungsmittelmoleküle	8178 (769)
R^c (R_{frei}^d)	0.1906 (0.2334)
Standardabweichung der Bindungslänge (Å)	0.021
Standardabweichung der Bindungswinkel (°)	1,74
% im Kernbereich (nicht erlaubt) im Ramachandran Blot	91,6 (0;0)
^a native Vollständigkeit. ^b R_{sym} ist der nicht gewichtete R Wert von I zwischen symmetrieverwandten Molekülen. ^c $R = \sum_{hkl} F_o(hkl) - F_c(hkl) / \sum_{hkl} F_o(hkl) $ für Reflexe im bearbeiteten Datensatz ^d $R_{\text{frei}} =$ der crossvalidierte R Faktor für 5% der Reflexe, die nicht mit verfeinert wurden.	

4.6 Struktur von *pfu* ABCE1 N2

Bereits vor Beginn der Arbeit haben Sequenzanalysen gezeigt, dass ABCE1 zur „ATP binding cassette“ (ABC) Proteinfamilie gehört. Obwohl innerhalb der Familie der ABC Proteine große funktionelle Unterschiede bestehen, haben alle diese Enzyme eine gemeinsame Architektur. Sie enthalten immer eine Nukleotidbindungsdomäne (NBD) mit konservierten Motiven. Im Gegensatz zu allen bisher bekannten Strukturen von ABC ATPasen enthält ABCE1 zwei NBD (NBD 1 und NBD 2) und zusätzliche, für diese Proteinfamilie neuartige Domänen. Das Modell von *pfu* ABCE1 N2 zeigt, dass diese ABC ATPase aus drei großen Domänen und einer kleinen Domäne besteht. Neben den beiden NBD (NBD 1 bzw. NBD 2) enthält es eine Scharnierregion (zusammengesetzt aus Hinge I + Hinge II), die die beiden NBD verbindet. Die drei großen Domänen (NBD 1, NBD 2 und Scharnierregion) formen eine „V-förmige“ Struktur mit einer Dimension von ca. 75 Å x 50 Å x 50 Å. Eine kleine Helix-Loop-Helix Domäne sitzt seitlich der NBD 1 (Abbildung 4.6).

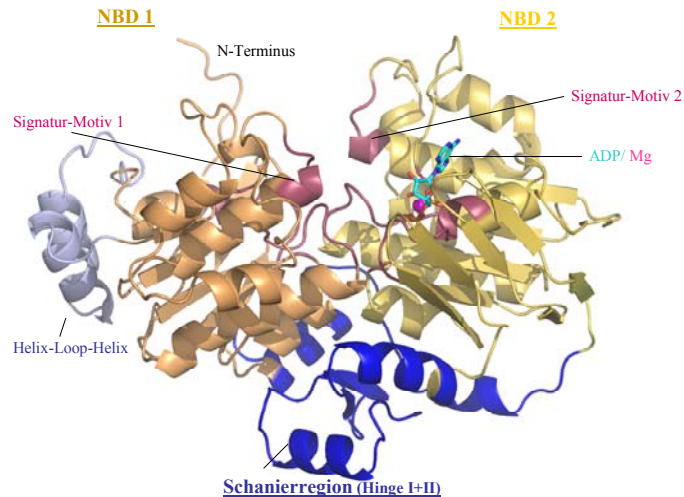


Abbildung 4.6 Darstellung der Struktur von pfu ABCE1
 Die drei großen Domänen aus NBD 1 (braun), NBD 2 (gelb) und der Scharnierregion (blau) bilden ein „V“. NBD 1 enthält noch eine kleine Helix-Loop-Helix-Domäne (grau). pfu ABCE1 hat ADP (cyan) gebunden. Konservierte Motive der ABC ATPasen sind rot dargestellt.

4.6.1 Die Nukleotidbindungsdomänen

Beide NBD haben eine ähnliche dreidimensionale Struktur, die wiederum eine Anzahl von speziellen Sequenzmotiven enthält. Die Struktur dieser Sequenzmotive ist für die ATP-Bindung und Hydrolyse entscheidend. Jede der beiden ca. 200 Aminosäurereste großen NBD enthält die fünf konservierten Motive der ABC ATPasen, das Walker-A Motiv, das Walker-B Motiv + D-Loop, das Signatur-Motiv, den Q-Loop und den H-Loop (Hopfner et al., 2000; Hung et al., 1998) (siehe Abbildung 1.4, Einleitung). Die ABC Typ ATPase Motive liegen in zwei strukturellen Untereinheiten (Abbildung 4.7). Die 1. Untereinheit besitzt einen α/β -Fold mit einer zentralen α -Helix (αA von NBD 1 bzw. αL von NBD 2), die zwischen zwei β -Faltblättern liegt (Abbildung 4.8). Die zentrale α -Helix enthält die primäre ATP Bindungsstelle, den P-Loop mit dem Walker-A Motiv (Aminosäuren GX_4GKS/T). Weiterhin enthält Untereinheit 1 beider NBD den Q Loop (mit einem Glutamin) und den H-Loop (benannt nach dem phylogenetisch konservierten Histidin).

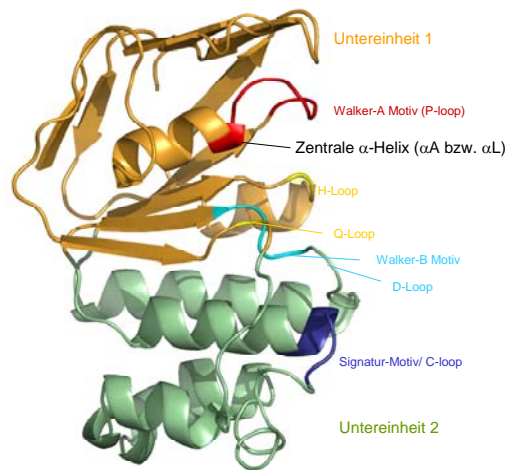


Abbildung 4.7 *Jede NBD mit den fünf konservierten Motiven lässt sich strukturell in zwei Untereinheiten teilen*
 Untereinheit I (braun) enthält das Walker-A Motiv (rot), den H-Loop und den Q-Loop (beide gelb). Zwischen Untereinheit I und Untereinheit II liegen das Walker-B Motiv und der D-Loop (hellblau). Die Untereinheit 2 (grün) enthält das Signatur-Motiv (dunkelblau).

Untereinheit 2 beider NBD ist vorwiegend α -helikal, mit dem für ABC ATPasen charakteristischen Element, einer α -helikalen Subdomäne (α H von NBD 1 bzw. α Q von NBD 2) mit dem Signatur-Motiv (C-Loop (Aminosäuren LSGGQ)). Die Region zwischen dem Q-Loop und dem Signatur-Motiv ist eine strukturell sehr unterschiedlich ausfallende Region („structurally diverse region“ (SDR)) und bei ABC Transportern und Proteinen der SMC Familie wichtig für die Kommunikation mit anderen Domänen (Hopfner and Tainer, 2003; Schmitt and Tampe, 2002). Zwischen beiden Untereinheiten liegt ein gemeinsames β -Faltblatt (Strang 3, 4, 5, 6, 7 bzw. 15, 16, 17, 18, 19, Abbildung 4.8), welches das Walker-B Motiv ($\phi\phi\phi\phi$ DE, ϕ hydrophobe Aminosäure) und den D-Loop (SAYLD) enthält (Hopfner and Tainer, 2003). Außerhalb der NBD 1 liegt eine Helix-Loop-Helix Domäne (α B und α C). Die Scharnierregion setzt sich aus zwei Suddomänen zusammen. Hinge I wird aus einer kurzen Sequenzregion zwischen den beiden NBD gebildet und formt eine kleine α/β Struktur (α K und β 9, β 10). Durch einen flexiblen Linker ist Hinge I mit der NBD 2 verbunden. Hinge II wird aus der sehr konservierten C-terminalen Region von ABCE1 gebildet. Er enthält zwei β -Stränge, die von zwei α -Helices eingerahmt werden (α T, β 22, β 23, α U) (Abbildung 4.8).

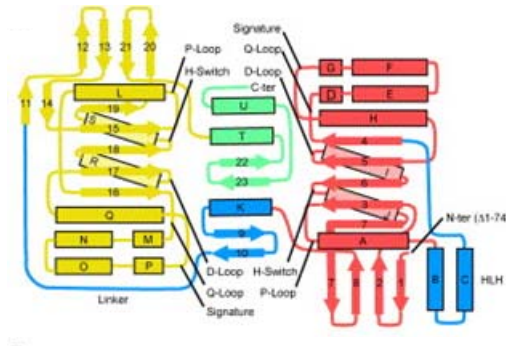


Abbildung 4.8 **Topologiediagramm von pfu ABCE1 N2.**

Sekundärstrukturelemente werden wie folgt dargestellt: Pfeile, β Stränge; Zylinder, α Helices. ABCE1 enthält zwei ABC Typ ATPase Domänen (orange, NBD1; gelb, NBD2 und weiterhin drei für ABCE1 einzigartige Subdomänen (blau, Hinge I und Helix-Loop-Helix; grün, Hinge II).

Beide NBD sind so orientiert, das die Untereinheit 1 der NBD 1 gegenüber der NBD2-Untereinheit 2 liegt und umgekehrt (Abbildung 4.9). Zwischen beiden NBD befindet sich ein Spalt, („active site cleft“). An diesem ca. 10 Å tiefen und 5-15 Å breiten Spalt liegen die aktiven Zentren des Moleküls (siehe 4.6.2).

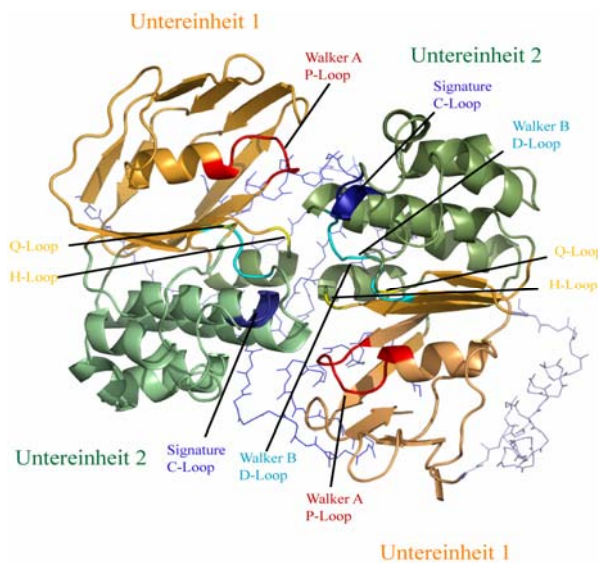


Abbildung 4.9 **Die beiden Untereinheiten der beiden NBD liegen zueinander in einer Kopf-zu-Fuß Ausrichtung.**

Die NBD sind so orientiert, das von der NBD 1 die Untereinheit 1 (braun) gegenüber der NBD 2 Untereinheit 2 (grün) liegt und umgekehrt. Zwischen beiden NBD befindet sich ein Spalt mit den aktiven Zentren. Die beiden Untereinheiten 1 enthalten jeweils das Walker-A Motiv (rot), den H-Loop und den Q-Loop (beide gelb). Zwischen Untereinheit I und Untereinheit II liegen immer das Walker-B Motiv und der D-Loop (hellblau). Die Untereinheiten 2 enthalten das Signatur-Motiv (dunkelblau).

Die NBD haben nur eine kleine Berührungsfläche, die sich hauptsächlich aus zwei konservierten Loops, dem D-Loop und dem H-Loop zusammensetzt. Beide Loops spielen bei den ABC ATPasen, die Homodimere bilden, bei der Dimerisierung und ATP gesteuerten Konformationsänderungen eine Rolle (Hopfner and Tainer, 2003; Schmitt and Tampe, 2002).

4.6.2 Das aktive Zentrum

Zwischen den beiden NBD, am Eingang des Spaltes liegen die beiden aktiven Zentren von ABCE1. Beide aktive Zentren werden von den Walker-A und Walker-B Motiven, sowie dem Q-Loop der einen NBD und dem Signatur-Motiv der gegenüberliegenden NBD gebildet (Abbildung 4.10).

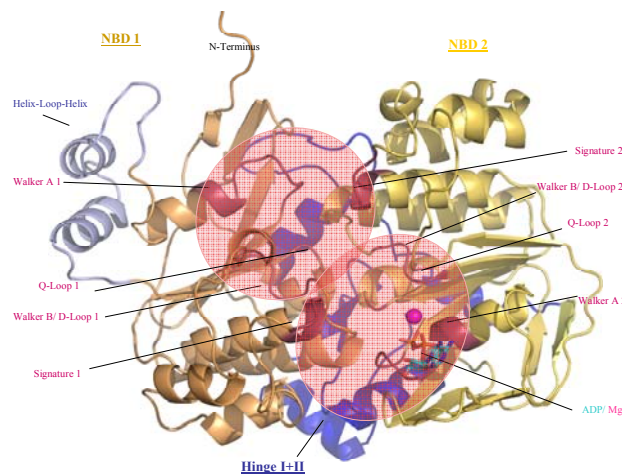


Abbildung 4.10 Am Eingang eines Spaltes liegen die beiden aktiven Zentren von ABCE1
Die zwei aktiven Zentren (rote Kreise) werden von dem Walker-A Motiv, dem Walker-B Motiv und dem Q-Loop der einen NBD und dem Signatur-Motiv der gegenüberliegenden NBD gebildet.

Überraschenderweise ließen sich in der Elektronendichte von *pfu* ABCE1 N2 ein ADP und ein Magnesiumion im aktiven Zentrum der NBD 2 erkennen (Abbildung 4.11). Da ADP bei der Kristallisation nicht zugegeben worden war, musste es sich um ein endogenes ADP aus *E.coli* handeln, das während der gesamten Aufreinigung und Kristallisation fest an das Protein gebunden war.

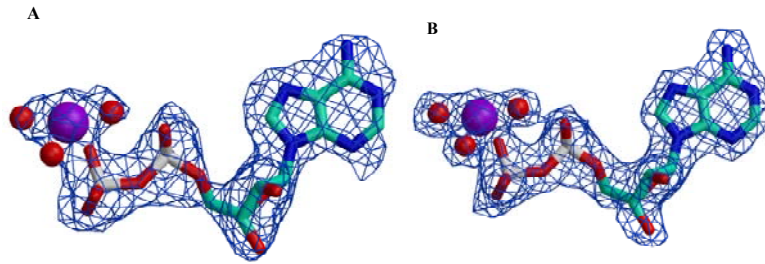


Abbildung 4.11 **Elektronendichte von ADP und Mg^{2+} im aktiven Zentrum**
 Experimentelle „single anomalous dispersion“ (SAD) (A) und $2F_o - F_c$ (B)
 Elektronendichte von ADP und Mg^{2+} im aktiven Zentrum (Kontur: 1σ).

Der Adeninring des ADP Moleküls liegt in einer flachen, aromatischen, hydrophoben Grube, mit einem konservierten Tyrosin (Y-Loop, Abbildung 5.9). Das Diphosphat des gebunden Nukleotids wird durch das Walker-A Motiv (GX_4GKS/TT) koordiniert (Abbildung 4.12).

Dabei werden das α -und β -Phosphat von ADP (bzw. ATP) durch das konservierte Lysin des P-Loops, den Seitenketten-Sauerstoffen der Threonine sowie durch Amide der Proteinhauptkette gebunden. Die negative Ladung des Phosphates wird durch die Reste Lysin und Asparagin des P-Loops kompensiert.

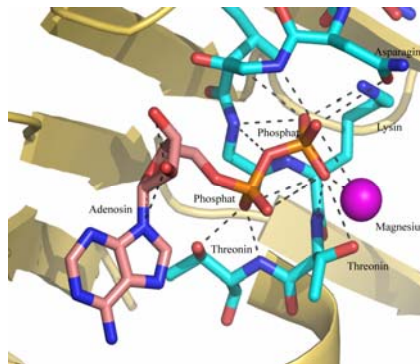


Abbildung 4.12 **Modell von ATP und Magnesium im aktiven Zentrum**
 Das Diphosphat des gebunden Nukleotids wird durch das Walker-A Motiv (Aminosäuren GX_4GKTT) koordiniert.

Im Walker-B Motiv ($\phi\phi\phi\phi DE$, ϕ hydrophobe Aminosäure) bindet die Aspartat-Seitenkette ein Wassermolekül, welches wiederum das Magnesiumion koordiniert (Abbildung 4.13). Durch ein konserviertes Glutamat wird ein weiteres Wassermolekül

polarisiert, welches dann das γ -Phosphat des ATP nukleophil angreifen kann. Das im aktiven Zentrum gebundene Magnesium wird durch die Sauerstoffe des β - und γ -Phosphats von ADP, durch die konservierten Reste Serin bzw. Threonin des Walker-A Motivs, Glutamin des Q-Loops sowie zwei Wasser, die durch das Aspartat und Glutamat im Walker-B Motiv gebunden sind, koordiniert (Hopfner et al., 2000) (Abbildung 4.13).

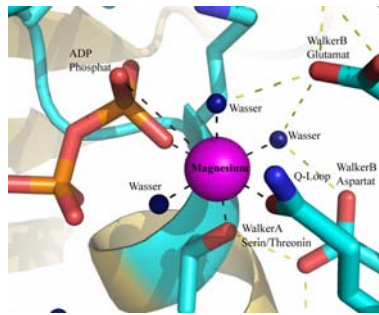


Abbildung 4.13 **Koordination des Magnesiums im aktiven Zentrum**
Das Walker-B Motiv koordiniert das Magnesiumion (lila).

Das bei allen ABC ATPasen konservierte Glutamin des Q-Loops (Q165 der NBD 1, Q406 der NBD 2), tritt in Kontakt mit dem Magnesiumion und dem nukleophil angreifenden Wasser im aktiven Zentrum. Dabei polarisiert es das angreifende Wassermolekül. Seine strukturelle Nachbarschaft zu angrenzenden funktionellen Regionen (strukturell diverse Region), wie z.B. die Transmembranregion bei ABC Transportern (Locher et al., 2002) oder die „coiled-coil“ Region in Rad50 oder SMC Proteinen, macht den Q-Loop zu einem wahrscheinlichen Signalübermittler der ATP induzierten Konformationsänderung (Hopfner et al., 2000; Karpowich et al., 2001; Smith et al., 2002). Ein weiterer hochkonservierter Rest bei ABC Proteinen, ein Histidin (H268 der NBD 1, H512 der NBD 2), befindet sich im danach benannten H-Loop und wird als γ -Phosphat Sensor beschrieben (Schmitt and Tampe, 2002). Es liegt an der Berührungsfläche zwischen NBD 1 und NBD 2 und könnte dadurch die Dimerisierung kontrollieren.

In andere ABC ATPasen wurde gesehen, dass sich, nach der Bindung von ATP an Walker-A, Walker-B und den Q-Loop der 1. Untereinheit, beide Untereinheiten reorientieren. Das ATP γ -Phosphat wird vom Signatur-Motiv der gegenüberliegenden NBD erkannt. Das Signatur-Motiv (LSGGQ) bindet den Sauerstoff des ATP γ -Phosphats

über die Seitenkette des konservierten Serins und dem Hauptkettenstickstoff des 2. Glycins. Die Bindung von ATP zwischen dem ABC Signatur-Motiv der einen Domäne und dem Walker-A Motiv der anderen Domäne führt zur Bildung eines Homo- bzw. Heterodimers. Die beiden NBD klappen zusammen und bilden ein „NBD-2ATP-NBD Sandwich“. ATP-Bindung und -Hydrolyse ist folglich nur in der dimeren Struktur der ABC ATPasen möglich.

4.6.3 Die Helix-Loop-Helix Domäne und die Scharnierregionen

ABCE1 enthält neben der für die ABC Familie charakteristischen NBD noch zusätzliche, neuartige Domänen, bei denen die oben beschriebene ATP induzierte Bewegung eine Konformationsänderung bewirken könnte. Seitlich der NBD 1, zwischen Walker-A und dem Q-Loop, befindet sich eine konservierte Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne (Abbildung 4.14). Eine ähnliche, wenn auch kürzere, helikale Insertion bei dem ABC Transporter BtuCD bildet eine Kontaktfläche zu assoziierten Transmembrandomänen (Locher et al., 2002). In MutS wird durch diese Domäne die NBD mit DNA-bindenden Domänen verbunden (Lamers et al., 2000; Locher et al., 2002).

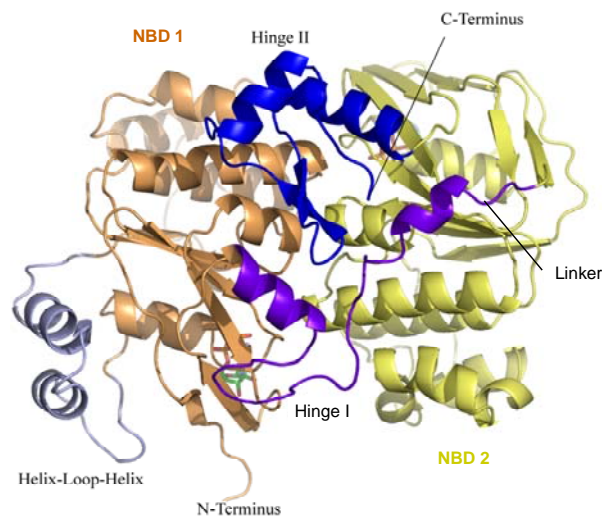


Abbildung 4.14 Blick auf die Scharnierregion von pfu ABCE1
Die Scharnierregion wird aus Hinge I (lila) und Hinge II (blau) gebildet und verbindet die beiden NBD. Die Helix-Loop-Helix Domäne (grau) liegt außerhalb der NBD 1.

Eine Scharnierregion, bestehend aus den Subdomänen Hinge I und Hinge II, verbindet strukturell NBD 1 und NBD 2. Hinge I hat α/β Struktur und liegt auch in der

Primärsequenz zwischen NBD 1 und NBD 2. Ein kurzer, flexibler Linker verbindet Hinge I mit der NBD 2. Die Flexibilität könnte großräumige Bewegungen zwischen den beiden NBD durch ATP Bindung erlauben. Hinge II befindet sich am sehr stark konservierten C-Terminus und besteht aus zwei β -Faltblättern, die von zwei α -Helices eingerahmt werden (Abbildung 4.14). Hinge I und Hinge II sind untereinander durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken fest verbunden. Diese Wasserstoffbrücken werden durch mehrere Arginine („Arginincluster“, R300, R 559, R560, R566, R568) gebildet. Diese Arginine sind zwischen allen Organismen extrem konserviert (siehe Sequenzalignment, Anhang).

4.6.4 Konservierte Bereiche

Um die Konservierung von ABCE1 zu untersuchen, wurde ein Vergleich zwischen ABC Enzymen mit Hilfe einer „BLAST“ Suche („Basic Local Alignment Search Tool“ (Altschul et al., 1997)) durchgeführt. Dabei wird Hilfe eines Algorithmus eine möglichst schnelle Suche nach homologen Proteinen ermöglicht. Die Signifikanz eines Treffers wird durch den E-Wert wiedergegeben. Je niedriger der E-Wert, umso höher ist die Signifikanz des Suchergebnisses. Dabei ist ABCE1 mit einem BLAST e-Wert von 2^{-152} zwischen Archaeen und Hefe das am höchsten konservierte ABC Protein überhaupt, das nächste konservierte ABC Enzym hat einen „Blast-Wert“ von 2^{-91} . Bei einem Vergleich aller Proteine aus dem Genom des Archaeen *Methanococcus jannaschii* und des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* ist ABCE1 mit einer Sequenzidentität von 45-50% sogar das am zweitstärksten konservierte Protein überhaupt. Ein Sequenzvergleich zwischen ABCE1 Proteinen befindet sich im Anhang.

Um wichtige Domänen an der Oberfläche zu identifizieren haben wir konservierte Reste von ABCE1 auf einer Oberflächendarstellung gekennzeichnet (Abbildung 4.15). Drei Oberflächenregionen zeigen in der Evolution hohe Konservierung. Der komplette aktive Spalt mit den beiden aktiven Zentren („active site cleft“) ist dabei am stärksten konserviert, wahrscheinlich, da die ATP Bindung und die damit verbundene Konformationsänderung eine universell erhaltene Antriebskraft für mechano-chemische Arbeit von ABC Proteinen ist. Ein weiterer konservierter Bereich von ABCE1 befindet sich am gekürzten N-Terminus (Aminosäuren 75-80 von *pfu* ABCE1). Ein dritter konservierter Bereich liegt an der Berührungsfläche von Hinge I und Hinge II, gebildet

von dem „Arginincluster“. Wie bereits beschrieben, könnte diese Region für ATP-abhängige Konformationsänderungen wichtig sein oder einen Bereich für eine makromolekulare Interaktionsseite darstellen.

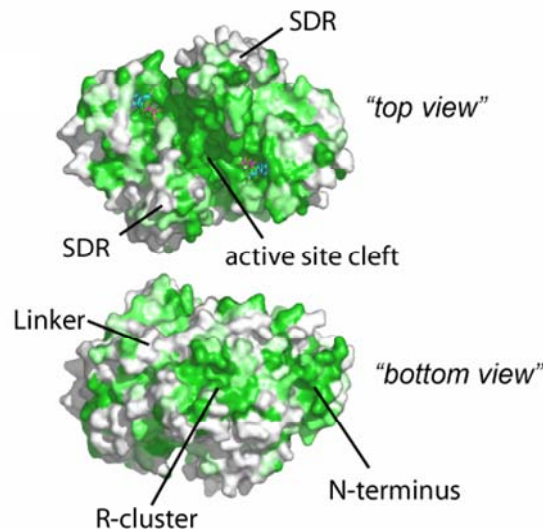


Abbildung 4.15 **Konservierte Bereiche von ABCE1**
 Obere Abbildung : Blick auf das aktive Zentrum (ADP, türkis, rot)
 Untere Abbildung: Blick auf die Scharnierregion. (Dunkelgrün, stark konserviert; hellgrün, weniger konserviert).

4.7 Das verbesserte Konstrukt ABCE1 Δ FeS aus *Pyrococcus furiosus* (*pfu* ABCE1 Δ FeS)

4.7.1 Konstruktion von *pfu* ABCE1 Δ FeS

Das ursprünglich verwendete Konstrukt „*pfu* ABCE1 N2“ (Reste 1-83 deletiert) kristallisierte langsam, über mehrere Wochen und die Kristalle waren nur schwer reproduzierbar. Die Auswertung der Struktur ergab, dass zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit kristallisierten und ein Dimer bildeten. Diese Dimerisierung war nur durch den neuen N-Terminus möglich. Die Reste 1-10 des verkürzten N-Terminus eines Moleküls interagierten mit einem β -Faltblatt 8 (Topologiediagramm Abbildung 4.8) des jeweils zweiten Moleküls der asymmetrischen Einheit (Abbildung 4.16). Kristallisation war nur durch diese Stabilisierung der N-Termini möglich, ansonsten hätten die flexiblen Termini vermutlich die Nukleation verhindert. Um korrekte Faltung des N-Terminus zu ermöglichen und so eine Dimerisierung zu verhindern, wurde der N-

Terminus bei dem nachfolgenden Konstrukt um zwölf Aminosäuren verlängert (Aminosäuren 72-588). Im Folgenden erwähnte Konstrukte ohne Eisen-Schwefel-Cluster, auch aus anderen Organismen entsprechen diesem Konstrukt und werden allgemein als ABCE1 Δ FeS bezeichnet.

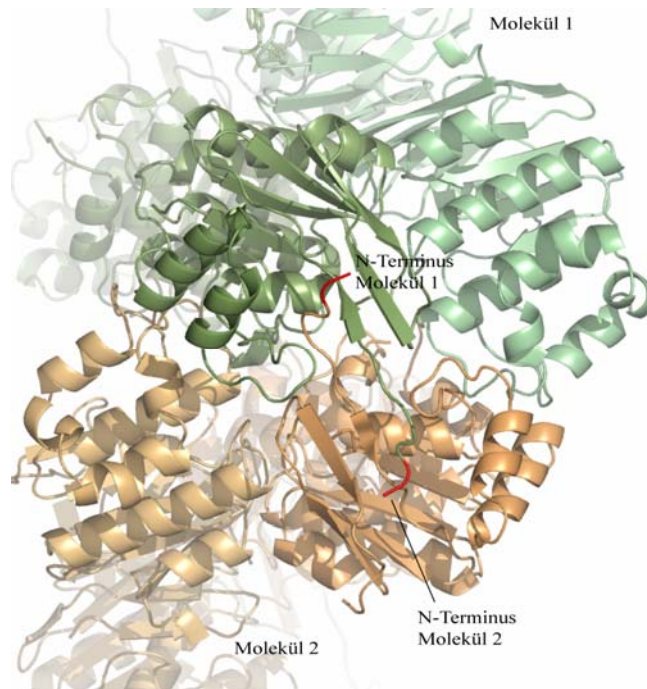


Abbildung 4.16 ***pfu ABCE1 kristallisierte mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit unter Bildung eines Dimers***
Beide N-Termini interagieren mit einem β -Faltblatt des jeweils anderen Moleküls

4.7.2 Kristallisation des Proteins ABCE1 Δ FeS aus *Pyrococcus furiosus*

Aufgrund des um zwölf Aminosäuren verlängerten N-Terminus änderten sich die Eigenschaften des Proteins während der Aufreinigung nicht. Die Klonierung des Gens, die Proteinreinigung und die Kristallisation wurden wie bei *pfu* ABCE1 N2 durchgeführt. Die bekannten Kristallisationsbedingungen des Konstruktes *pfu* ABCE1 N2 wurden in einem „Grid Screen“ verfeinert und ebenfalls verwendet. Verfeinerungen der Kristallisationsbedingungen, Substitution der Methionine durch Selenomethionin zur Aufnahme eines SAD Datensatzes, Bestimmung der Phasen und Strukturverfeinerungen wurde von Katharina Büttner im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Büttner, 2003).

Kristalle wurden sowohl beim nativen als auch beim Selenomethionin substituiertem Protein innerhalb weniger Tage erhalten. Wie das Protein *pfu* ABCE1 N2 kristallisierte es in der Raumgruppe $P2_12_12_1$, die Zellkonstanten waren $a=59,6 \text{ \AA}$, $b=74,6 \text{ \AA}$, $c=123,7 \text{ \AA}$, wobei ein Molekül in der asymmetrischen Einheit war (siehe Tabelle 4.2). Ein nativer Datensatz bis $1,9 \text{ \AA}$ und ein anomaler Datensatz bis $2,5 \text{ \AA}$ Auflösung wurden an der Beamline PX (Swiss Light Source, Villigen) aufgenommen. Zur Auswertung der Bilder ($0,5^\circ$ Drehung pro Bild) wurde die HKL Software (Otwinowski and Minor, 1997) verwendet. Mit Hilfe des Programms SOLVE (Terwilliger, 2002) konnten 8 der 9 Selenomethionine gefunden und daraus erste Phasen mit SHARP (La Fortelle and Bricogne) berechnet werden. Das endgültige Modell enthält 515 Reste (E76 bis zum nativen C-Terminus), außerdem zwei Mg^{2+} -Ionen, zwei ADP und 337 Wassermoleküle. Tabelle 4.2 enthält eine Zusammenfassung der kristallografischen Daten und der Ergebnisse aus der Verfeinerung (Buettner, 2003).

Tabelle 4.2 **Kristallografische Daten und Ergebnisse aus der Verfeinerung von *pfu* ABCE1 ΔFeS**

Kristallografische Datensammlung und Analyse	
Kristallografische Daten	
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Einheitszelle (\AA)	$a=59,6$, $b=74,6$, $c=123,7$ $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Röntgenstrahlungsquelle	PX
Wellenlänge (\AA)	0.9791
Auflösungsbereich (\AA)	30-1,9
Gemessen (anomal)	249.322 (44.451)
Vollständigkeit ^a (%) (letzte Schale)	95,2 (72)
R_{sym} ^b (letzte Schale)	0,076 (0,218)
$I/\sigma I$ (letzte Schale)	9,4 (3,0)
Verfeinerung	
Auflösungsbereich (\AA)	25–1,9
Reflexe $F > 0$ (Crossvalidierung)	43504 (2176)
Lösungsmittelmoleküle	4487 (337)
R^c (R_{frei} ^d)	0.199 (0.225)
Standardabweichung Bindungslänge (\AA)	0.012
Standardabweichung Bindungswinkel ($^\circ$)	1,5

% Kernbereich (nicht erlaubt) im Ramachandran Blot	92,0 (0,0)
^a Anomale Vollständigkeit. ^b R_{sym} ist der nicht gewichtete R Wert von I zwischen symmetrieverwandten Molekülen. ^c $R = \sum_{\text{hkl}} F_o(\text{hkl}) - F_{ca}(\text{hkl}) / \sum_{\text{hkl}} F_o(\text{hkl}) $ für Reflexe des bearbeiteten Datensatzes ^d R_{frei} = der crossvalidierte R Faktor für 5% der Reflexe, die nicht mit verfeinert wurden	

Obwohl viele Strukturen von NBD aus ABC Proteinen im Komplex mit verschiedenen Nukleotiden (ATP, ADP, und im Übergangszustand) bekannt sind, wird der Mechanismus der ATP-Bindung und Hydrolyse sowie die damit verbundene Konformationsänderung und die ADP-Freisetzung noch nicht genau verstanden (siehe 5.5).

Um die Struktur der ATP-gebundenen Form zu erhalten, wurden deshalb verschiedene Strategien getestet:

1. Kokristallisation der Volllängen und verkürzten Konstrukte mit ATP bzw. ATP Analoga: ADP + Orthovanadat, AMP-PNP, ADP + Berylliumfluorid (siehe Kapitel 4.8 und 4.9).
2. Denaturierung und Rückfaltung des Konstruktes *pfu* ABCE1 ΔFeS und anschließende Kokristallisation mit ATP und dessen Analoga.
3. Klonierung, Reinigung von ABCE1 aus anderen archaealen Organismen und Kokristallisation mit ATP und Analoga (siehe Kapitel 4.8).
4. Mutanten, die z.B. eine ATP-Hydrolyse verhindern (siehe Kapitel 4.9).

Zu 2.: Katharina Büttner hat im Rahmen ihrer Diplomarbeit versucht, *pfu* ABCE1 ΔFeS durch eine vollkommene Denaturierung, gefolgt von einer Renaturierung und anschließender Kristallisation des Proteins mit ATP bzw. dessen Analoga zu kristallisieren. Es konnte aber nicht in der geschlossenen, ATP-gebundene Konformation kristallisiert werden (Büttner, 2003).

4.8 Kristallisation und Strukturbestimmung der ABC ATPase Domäne von ABCE1 aus weiteren Organismen

Zur Kokristallisation von ABCE1 mit ATP bzw. dessen Analoga, wurde das Protein aus verschiedenen archaealen Organismen kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Ein Sequenzalignment von ABCE1 zwischen den Archaeen *Pyrococcus furiosus* (pfu), *Pyrococcus abyssi* (pab), *Archaeoglobus fulgidus* (afu) und *Sulfolobus solfataricus* (sso) (Abbildung 4.17) zeigt den Beginn der Konstrukte ohne Eisen-Schwefel-Cluster Domäne (Start ΔFeS).

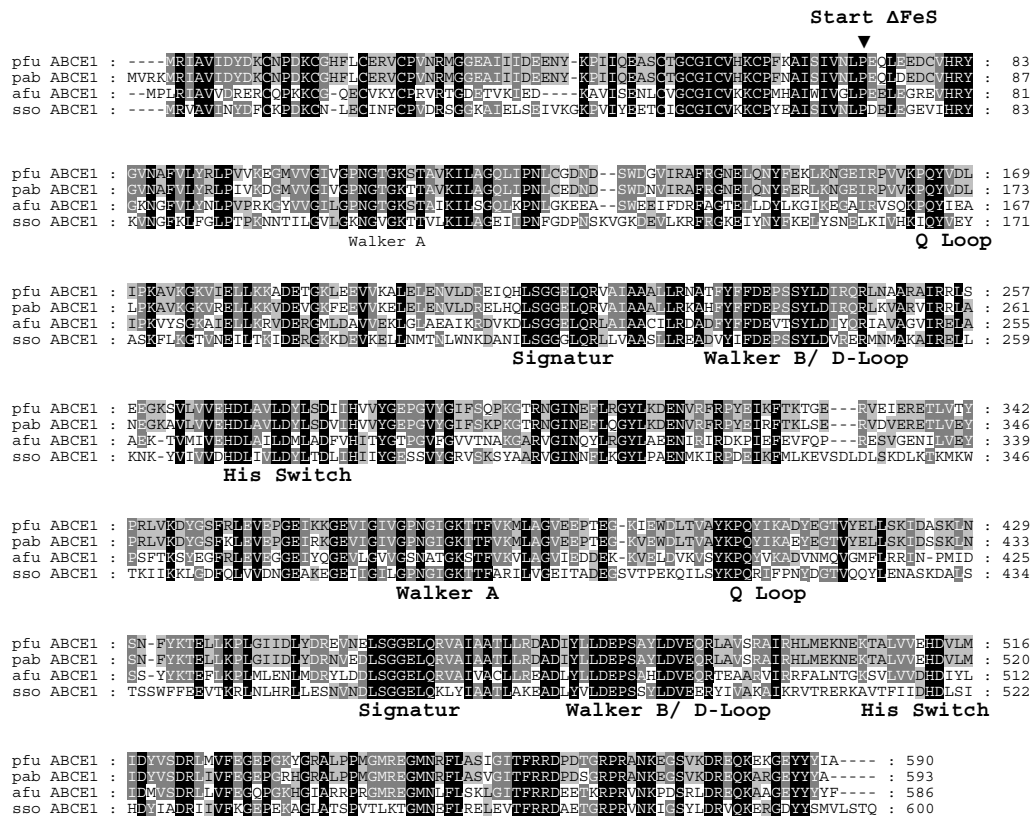


Abbildung 4.17 **Sequenzalignment archaealer ABCE1 Proteine**
Ein Vergleich der Sequenzen von pfu, pab, afu und sso ABCE1 zeigt, dass ABCE1 innerhalb der Archaeen sehr konserviert ist. Die Konstrukte ohne Eisen-Schwefel-Cluster Domäne beginnen alle an derselben Position (Start ΔFeS).

Zur Kokristallisation von ABCE1 mit ATP bzw. dessen Analoga, wurde das Protein aus verschiedenen archaealen Organismen kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Dabei wurden die Proteine mit 6xHis Tag am N- bzw. C-Terminus oder ohne Tag exprimiert. Die Tabelle 4.4 in Kapitel 4.15 enthält eine Zusammenstellung der verwendeten Konstrukte und die Ergebnisse.

Das Protein ABCE1 Δ FeS aus *Pyrococcus abyssi* (*pab* ABCE1 Δ FeS) konnte in großen Mengen überexprimiert werden. Für die Kristallisation wurde es über Ni-NTA Affinitätschromatografie (Abbildung 4.18), Anionenaustauscher und Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt. Proteinausbeuten lagen bei 14 mg/ml gereinigtes Protein pro Liter Expressionskultur.

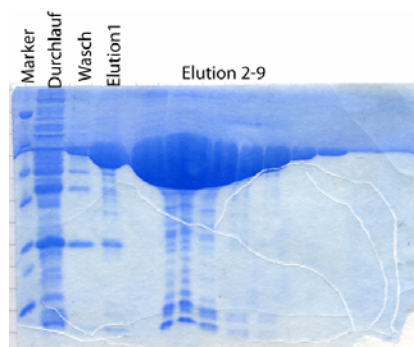


Abbildung 4.18 SDS- PAGE von *pab* ABCE1 Δ FeS nach Ni-NTA Affinitätschromatografie
Die einzelnen aufgetragenen Spuren enthalten Proben vom Durchlauf, dem Wasch-schritt und der Elution einer Ni-NTA, auf die *pab* ABCE1 Δ FeS aufgetragen wurde.

Zur Kristallisation des Proteins *pab* ABCE1 Δ FeS wurden 2 μ l des gereinigten Proteins (40 mg/ml in 20 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 5% Glycerin) mit 2 μ l der Präzipitationslösung zu einem Tropfen gemischt und bei Raumtemperatur mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode (sitzender Tropfen) langsam konzentriert.

Ein Teil der Proteinlösung wurde zusätzlich mit ATP-Derivaten versetzt. Dabei wurde zur Proteinlösung jeweils

1. 2 mM ADP, 5 mM Orthovanadat und 10 mM Magnesiumchlorid, bzw.
2. 2 mM Berylliumchlorid, 10 mM Natriumfluorid, 20 mM Magnesiumchlorid und 2 mM ADP, bzw.
3. 2 mM Aluminiumfluorid, 10 mM Natriumfluorid, 20 mM Magnesiumchlorid und 2 mM ADP

hinzugefügt. Dadurch sollte das Protein in der geschlossenen Konformation, entsprechend der ATP-gebundenen Form, kristallisiert werden. Nach drei Tagen konnten bei allen Ansätzen Kristalle beobachtet werden.

Das Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellkonstanten $a=59,804 \text{ \AA}$, $b=62,428 \text{ \AA}$, $c=147,273 \text{ \AA}$, mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. An der „Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) wurde ein Datensatz bis

zu einer Auflösung von 2,3 Å gemessen. Die Phasen wurden durch molekularen Ersatz mit Hilfe des CCP4 Programms AMoRe (Navaza, 1994) ermittelt, wobei als Modell die Struktur des Proteins *pfu* ABCE1 ΔFeS verwendet wurde. Die Struktur wurde nicht weiter verfeinert, der kristallografische R-Faktor lag deshalb bei 27,80%, der freie R-Faktor bei 32,70%. Wie bei *pfu* ABCE1 ΔFeS war ADP mitgereinigt und kokristallisiert worden. Der Übergangszustand, bzw. die geschlossene Konformation, die einer ATP-Bindung entspricht, konnten durch die ATP Derivate nicht erzeugt werden.

Des Weiteren wurde ABCE1 aus *Sulfolobus solfataricus* (*sso*) verwendet. *Sulfolobus solfataricus* ist wie *Pyrococcus* ein hyperthermophiler Organismus, der bei ca. 70°C bis 90°C optimal wächst. *sso* ABCE1 ΔFeS konnte kloniert und in großen Mengen überexprimiert werden. Reinigung erfolgte über Ni-NTA, Kationenaustauscher und Gelfiltration bis zur Homogenität. Im Gegensatz zu den Proteinen aus *pab* (theoretische pI: 5,85) und *pfu* (theoretischer pI: 5,64), die einen leicht sauren isoelektrischen Punkt haben, liegt der pI von *sso* ABCE1 ΔFeS mit 8,22 im leicht basischen Bereich. Deshalb ließ sich *sso* ABCE1 nicht über einen Anionenaustauscher reinigen, sondern über einen Kationenaustauscher (siehe Material und Methoden). Zur Kristallisation von *sso* ABCE1 ΔFeS wurden 2 µl des gereinigten Proteins (17 mg/ml in 20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 5% Glycerin) mit 2 µl der Präzipitationslösung zu einem Tropfen gemischt und bei Raumtemperatur mit der Hilfe Dampfdiffusionsmethode (sitzender Tropfen) vorsichtig konzentriert.

Zum Kokristallisieren wurden

1. 2,5 mM ATP und 20 mM MgCl₂, bzw.
2. 2 mM ADP, 5 mM Orthovanadat, 10 mM Magnesiumchlorid, bzw.
3. 2 mM ADP, 2 mM Berylliumchlorid, 10 mM Natriumfluorid, 20 mM Magnesiumchlorid

hinzugefügt. Dadurch sollte das Protein in der geschlossen, das entspricht der ATP-gebundene Konformation kristallisiert werden. Nach drei Tagen konnten bei den Bedingungen mit ATP Kristalle beobachtet werden. Die Kristallisationsbedingung war aus dem Hampton Natrix Screen #19 und enthielt folgende Bestandteile:

0,01 MgCl₂
0,05 MES, pH 5,6
2,0 M LiCl

Das Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P3_1$ mit den Zellkonstanten $a=59,804 \text{ \AA}$, $b=62,428 \text{ \AA}$, $c=147,273 \text{ \AA}$, mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Daten bis zu einer Auflösung von $2,3 \text{ \AA}$ wurden an der „Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) gesammelt. Die Phasen wurden durch molekularen Ersatz mit Hilfe des CCP4 Programms AMoRe (Navaza, 1994) ermittelt, wobei als Modell die Struktur des Proteins *pfu* ABCE1 Δ FeS verwendet wurde. Es konnte kein ATP bzw. ATP-Analoga und keine Konformationsänderung in der Struktur beobachtet werden. Wie bei den bereits beschriebenen Konstrukten war ADP mitgereinigt und kokristallisiert worden und konnte nicht ersetzt werden. Nach dem manuellen Einbauen der Aminosäuresequenz wurde die Struktur nicht weiter verfeinert.

4.9 Mutanten von ABCE1

4.9.1 Mutationen im D-Loop: Die Y244F Mutante

In einer 2003 veröffentlichten Arbeit beschreiben Lamers *et al.* (Lamers et al., 2003) die Mutation eines konservierten Argininrestes in MutS, der sich direkt an das Walker-B Motiv anschließt und im D-Loop liegt. Dort haben Auswertungen der Kristallstruktur ergeben, dass bei der Bildung des Homodimers der Rest R697 jeder NBD die gegenüberliegende NBD kontaktiert. Dabei unterstützt der Rest R697 die Nukleotidbindung der einen NBD, verhindert aber gleichzeitig die Nukleotidspaltung durch die zweite NBD. Dadurch haben die beiden NBD unterschiedliche Affinität zu ATP. Durch die Mutation des Arginins zu Alanin (R697A) geht diese Asymmetrie verloren und die DNA „mismatch“ Reparatur ist beeinträchtigt (Lamers et al., 2003). An der entsprechenden Position befinden sich bei ABCE1 in den D-Loops zwei konservierte Tyrosine (Y244) und (Y487), die in der ADP-gebundenen Form in den Spalt des aktiven Zentrums hineinragen (Abbildung 4.19). Der Abstand zwischen den Seitenketten von Y244 und Y487 beträgt $4,23 \text{ \AA}$, damit bilden die OH-Gruppen eine schwache Wasserstoffbrückenbindung aus. Um die Funktion von Y244 und Y487 in ABCE1 zu ermitteln, wurde eine Mutante kloniert, bei der Y244 zu Phenylalanin mutiert war (Mutante *pab* ABCE1 Δ FeS Y244F).

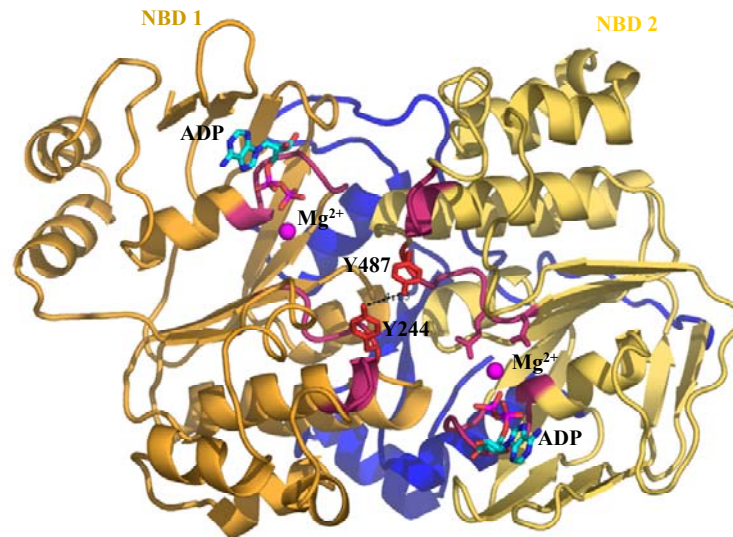


Abbildung 4.19 **Mutationen des D-Loops**

Beide D-Loops enthalten zwei konservierte Tyrosine (Y244) und (Y487) (beide rot), die in den „active site cleft“ hineinragen. In der ADP-gebundenen Form bildet sich zwischen beiden Seitenketten eine Wasserstoffbrückenbindung aus.

Das Protein konnte in großen Mengen in *E. coli* überexprimiert werden und über Ni-NTA Affinitätschromatografie, Anionenaustauscher und Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt und auf eine Endkonzentration von 26 mg/ml konzentriert werden. Zur Kristallisation von *pab* ABCE1 ΔFeS Y244F wurden jeweils 2 µl des gereinigten Proteins (26 mg/ml in 20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 5% Glycerin) mit jeweils 2 µl der Präzipitationslösung gemischt und bei Raumtemperatur mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode (sitzender Tropfen) vorsichtig konzentriert. Zum Kokristallisieren wurden

1. 2 mM ADP, 5 mM Orthovanadat und 10 mM Magnesiumchlorid, bzw.
2. 2 mM Berylliumchlorid, 10 mM Natriumfluorid, 20 mM Magnesiumchlorid und 2 mM ADP, bzw.
2. 2 mM Aluminiumfluorid, 10 mM Natriumfluorid, 20 mM Magnesiumchlorid und 2 mM ADP

hinzugefügt. Dadurch sollte das Protein in der geschlossenen Konformation, entsprechend der ATP-gebundenen Form, kristallisiert werden.

Das Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellkonstanten $a=60,65 \text{ \AA}$, $b=62,95 \text{ \AA}$, $c=151,16 \text{ \AA}$, mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. An der

„Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) wurde ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 3 Å gesammelt. Die Phasen wurden durch molekularen Ersatz mit Hilfe des CCP4 Programms AMoRe (Navaza, 1994) ermittelt, wobei als Modell die Daten des Proteins *pab* ABCE1 ΔFeS verwendet wurde. Es konnte kein ATP bzw. ATP-Analoga und keine Konformationsänderung in der Struktur beobachtet werden. Wie bei den bereits beschriebenen Konstrukten war ADP mitgereinigt und kokristallisiert worden und konnte nicht ersetzt werden. Nach dem manuellen Einbauen der Aminosäuresequenz wurde die Struktur nicht weiter verfeinert, der kristallografische R-Faktor lag deshalb 31,5%, der freier R-Faktor bei 33,76%. Wie bei *pfu* ABCE1 ΔFeS und *pab* ABCE1 ΔFeS war ADP mitgereinigt und kokristallisiert worden und konnte nicht ersetzt werden.

Während bei MutS der Rest R697 die Nukleotidbindung der einen NBD unterstützt und gleichzeitig die Nukleotidspaltung durch die zweite NBD verhindert, konnte bei *pab* ABCE ΔFeS Y244F keine verbesserte ATP-Bindung beobachtet werden. Eine Konformationsänderung war nicht zu beobachten.

4.9.2 Mutanten des aktiven Zentrums

Mutanten von Aminosäuren im aktiven Zentrum wurden z.T. von Katharina Büttner kloniert und auch zu biochemischen Untersuchungen verwendet (Buettner, 2003). Eine Übersicht der hergestellten Mutanten befindet sich in Kapitel 4.15.

Mutationen des Signatur-Motivs

Bei anderen ABC ATPase wurde beobachtet, dass sich nach der Bindung von ATP an Walker-A, Walker-B und den Q-Loop beide Untereinheiten neu orientieren. Das ATP-γ-Phosphat wird zudem vom Signatur-Motiv der gegenüberliegenden NBD erkannt und gebunden (Hopfner et al., 2000). Um diese Dimersierung zu verhindern, wurde bei der Mutante *pab* ABCE1 ΔFeS S216A das konservierte Serin des Signatur-Motivs zu Alanin mutiert (durchgeführt von Katharina Büttner). Diese Mutante kristallisierte in der Raumgruppe P3₂ und den Zellkonstanten a=98,460 Å, b= 98,460 Å, c=133,502 Å, α=β=90,00, γ=120,00. Die ermittelte Struktur unterschied sich nicht von den bisher gelösten Strukturen von ABCE1.

Mutation des Walker-B Motivs und des D-Loops

Bei ABC ATPasen greift in der ATP-gebundenen Form ein Wassermolekül, welches durch das konservierte Glutamat im Walker-B koordiniert wird, das γ -Phosphat des ATP nukleophil an. Lammens et al. verwendeten zur Kristallisation der katalytischen Domäne der ABC ATPase SMC aus *Pyrococcus furiosus* in Komplex mit ATP eine ATPase inaktive Mutante, bei der das Glutamat im Walker-B Motiv durch Glutamin ersetzt wurde. Dadurch konnte der ATP-gebundenen Komplex stabilisiert werden (Abrahams and Leslie, 1996; Adman et al., 1973; Lammens et al., 2004). Um die ATP-gebundene Form bei ABCE1 zu stabilisieren, wurden sowohl in jeweils einem, als auch in beiden Walker-B Motiven im aktiven Zentrum das konservierte Glutamat zu Glutamin mutiert (Mutanten *pab* ABCE1 Δ FeS E240Q, *pab* ABCE1 Δ FeSE483Q, *pab* ABCE1 Δ FeS E240Q-E483Q). Diese Mutanten wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert und von Katharina Büttner für funktionelle Experimente eingesetzt.

Zur Kristallisation wurde eine Dreifachmutante verwendet, die sowohl die Y244F Mutation im D-Loop, als auch die Mutationen in beiden Walker-B Motiven (E240Q, E483Q) enthielt (*pab* ABCE1 Δ FeS Y244F-E240Q-E483Q). Auch diese Mutante konnte nicht im Komplex mit ATP kristallisiert werden. Wie bei allen bereits beschriebenen Konstrukten war ADP mitgereinigt und kokristallisiert worden.

4.10 Vergleich der Proteinstrukturen von ABCE1 Δ FeS

Um die ermittelten Strukturen zu vergleichen, wurden die „Backbone/ Ribbon“ Modelle der unterschiedlichen ABCE1 Strukturen mit Pymol übereinander gelegt. Dazu wurden folgende kristallografisch untersuchten ABCE1 Konstrukte verglichen:

1. Strukturen aus verschiedenen Organismen (*pfu* (türkis und gelb) und *pab* (lila und orange))
2. Strukturen aus gleichen Organismen, die sich in der Länge ihrer N-Termini unterscheiden (*pfu* ABCE1 Δ FeS (türkis) und *pfu* ABCE1 N2 (gelb))
3. Strukturen mit gleichen N-Termini und unterschiedlichen kristallografischen Raumgruppen (*pab* ABCE1 Δ FeS (P2₁2₁2₁), (lila) und *pab* ABCE1 Δ FeS (S216A) (P3₂), (orange))

verglichen. Diese Übereinanderlagerung lässt erkennen, dass alle Moleküle annähernd

identisch sind (Abbildung 4.20).

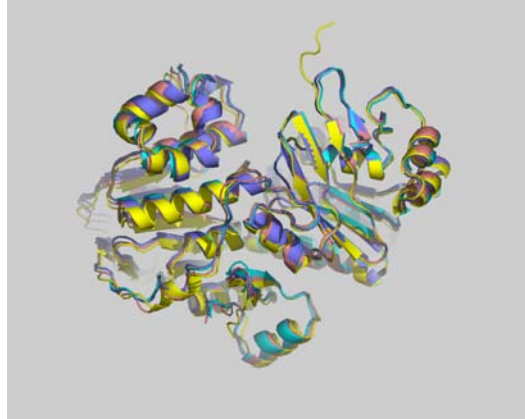


Abbildung 4.20 *Überlagerung der ermittelten Strukturen*
 Eine Überlagerung der Strukturen von pfu ABCE1 Δ FeS (türkis), pfu ABCE1 N2 (gelb), pab ABCE1 Δ FeS (lila), pab ABCE1 Δ FeS (S216A) (orange) ergibt, dass sich die Strukturen nicht unterscheiden.

4.11 Der Eisen-Schwefel-Cluster

ABCE1 ist ein cytoplasmatisches Protein, das am N-Terminus zwei cysteinreiche Regionen enthält. Beide Regionen sind in allen ABCE1 Sequenzen sehr konserviert. Diese cysteinreiche Domäne hat große Sequenzähnlichkeit mit bekannten vier Eisen- vier Schwefel [4Fe-4S]- Cluster Domänen z.B. mit dem [4Fe-4S]- Clustertyp von Ferredoxinen (Kerr, 2004). Ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von Eisenionen in ABCE1 war die auffällige, konzentrationsabhängige Braunfärbung der ABCE1-enthaltenden Lösungen, während die ABCE1 Δ FeS Proteinlösungen farblos waren (Abbildung 4.21).

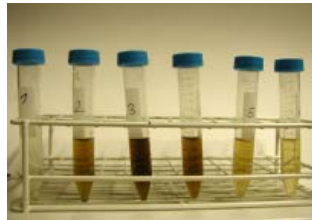


Abbildung 4.21 *Gereinigtes ABCE1 Protein hat eine braune Farbe (Abb.: Katharina Büttner (Buettner, 2003))*
 Die abgebildeten Röhrchen enthalten unterschiedliche Konzentrationen von ABCE1, wobei Röhrchen #3 die höchste Proteinkonzentration enthält. Die weiteren Proteinkonzentrationen nehmen in der Reihenfolge der Röhrchen 4, 2, 5, 6, 1 ab. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Braunfärbung konzentrationsabhängig ist.

4.11.1 Vorarbeiten für die Kristallisation von *pab* ABCE1

Durch die heterologe Expression in *E. coli* und die aerobe Aufreinigung von ABCE1 kann die vollständige Inkorporation von Eisen und Schwefel in die Eisen-Schwefel (FeS)-Cluster gestört sein (Roland Lill, persönliche Auskunft). Deshalb war es notwendig ein System zu entwickeln, um funktionelle FeS-Cluster zu erhalten.

Konstruktion der Vektoren pET-28 N-Strep und pET-29 C-Strep

Alle bisherigen Konstrukte von ABCE1 waren so gewählt worden, dass sie entweder ohne einen zusätzlichen Tag gereinigt wurden (schlechte Reinigungsergebnisse) oder einen N- bzw. C-terminalen 6xHis-tag enthielten. Die Bildung eines funktionellen FeS-Clusters kann jedoch durch einen 6x His -tag gestört werden (Holger Dobbek, persönliche Auskunft). Um einen möglichst funktionellen Protein-Eisen-Komplex zu erhalten, wurde der 6x-His-tag durch ein Strep-tag II Peptid ersetzt. Dadurch wurde eine effiziente und spezifische Reinigung über eine StrepTactin (IBA) Affinitätschromatografie möglich. Der Strep-tag II ist ein kurzes Peptid aus nur 8 Aminosäuren (WSHPQFEK) welches am N-bzw. C-Terminus von ABCE1 als Fusionsprotein mit exprimiert wurde. Um das Strep-tag II Peptid mit dem gewünschten Protein zu fusionieren, wurden die Vektoren pET-28 und pET-29 (Novagen) so modifiziert, dass die kodierende Sequenz für das Peptid und einen kurzen Linker, innerhalb der „multiple cloning site“ der Vektoren eingesetzt wurde (siehe Abbildung 3.1 und 3.2, Material und Methoden).

Mechanismus der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese

Während die Eisenquelle für den Zusammenbau von FeS-Clustern nicht bekannt ist, ist bekannt, dass der Schwefel von pyridoxalabhängigen Cysteindesulfurasen bereitgestellt wird (Leimkuhler and Rajagopalan, 2001). In Bakterien gibt es drei separate Systeme für die FeS-Cluster Biosynthese: das ISC (Iron-sulfur-cluster), das NIF („N₂fixation“) und das SUF („sulfur“) System. Das mitochondriale ISC-System der Eukaryoten hat eine große Sequenzähnlichkeit mit dem bakteriellen ISC-System und ist nicht nur für die Assemblierung der mitochondrialen FeS Proteine zuständig, sondern auch für die Biosynthese der cytosolischen- und nukleären- FeS Proteine. Die Fertigstellung der extramitochondrialen Proteine ist sowohl von dem mitochondrialen ISC-Export System

als auch von dem cytosolischen FeS Assemblierungssystem (CIA) abhängig (Lill et al., 2005). Die pyridoxalphosphatabhängige Cysteindesulfurasen IscS/ NifS und SufS aus Bakterien bzw. Mitochondrien stellen den Schwefel für die Biosynthese von FeS-Cluster Proteinen zu Verfügung. Sie katalysieren dabei die reduzierende Abtrennung des Schwefels von L-Cystein, wobei Alanin und ein IscS-Persulfid entstehen. Für diese Reaktion wird zusätzlich Pyridoxalphosphat als Aktivator des Cysteins gebraucht (Johnson et al., 2005) (Abbildung 4.22).

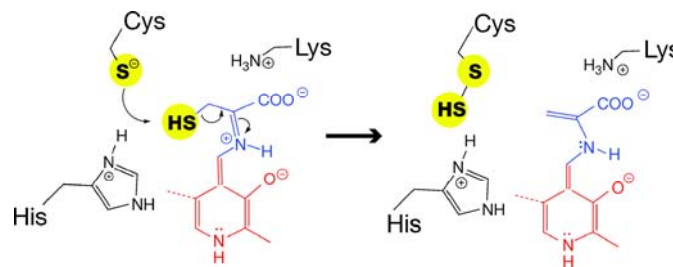


Abbildung 4.22 **Mechanismus der NifS/ IscS Cystein Desulfurasen**

Schwefel wird unter Bildung eines Cysteinpersulfid Zwischenproduktes von Cystein abgespalten. Das an die Cysteindesulfurase gebundene Persulfid entsteht durch den nukleophilen Angriff des Thiolat-Anions des Cysteins im aktiven Zentrums auf den Schwefel des Substrat Cysteins (blau) (Pyridoxalphosphat, rot). Das Substrat Cystein wird dadurch zu Alanin (Johnson and Dean, 2004).

Der Schwefel wird anschließend direkt auf ein Gerüstprotein (IscU in Bakterien bzw. IscU1 (und IscU2 in Hefe) in Eukaryoten) übertragen (Cupp-Vickery et al., 2003; Urbina et al., 2001) und kann in FeS Proteine eingebaut werden (Abbildung 4.23).

Der Mechanismus zur Reparatur von oxidierten 4Fe-4S-Clusters in *E. coli* unterscheidet sich von der FeS-Cluster Biosynthese. Leimkuhler *et al.* klonierten und reinigten erstmals die Cysteindesulfurasen aus allen drei bakteriellen FeS Systemen und konnten zeigen, dass mit diesen Enzymen der Schwefel eines Cysteins direkt auf die Dithiolen-Gruppe eines Proteins (Molybdopterin) übertragen werden kann (Leimkuhler and Rajagopalan, 2001). In anderen Arbeiten wurden dann Cysteindesulfurasen auch für die Rekonstitution von FeS-Cluster Proteine verwendet (Gubernator et al., 2003; Kurihara et al., 2003).

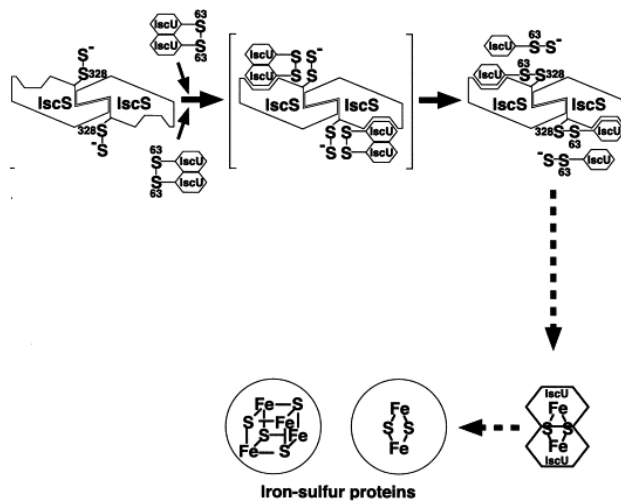


Abbildung 4.23 Biosynthese von Eisen-Schwefel-Proteinen
Der Schwefel des IscS-Persulfids wird auf das Gerüstprotein IscU übertragen und dann in FeS Proteine eingebaut (Kurihara et al., 2003).

Klonierung und Reinigung von IscS

IscS ist ein Enzym der bakteriellen FeS-Cluster Biosynthese. Das Gen konnte deshalb mit Hilfe der PCR aus der genomischen DNA von *E. coli* amplifiziert werden. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in einen pET-28 Vektor (Novagen) gesetzt. Nach Induktion mit IPTG erfolgte die Proteinexpression in einem *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-RIL Stamm (12 l LB-Medium, 37°C ,4h). Nach Zellaufschluss wurde das Protein über Anionenaustauschchromatografie (HighTrapQ-Säule), Ammoniumsulfatpräzipitation, hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatografie (HighTrap Phenyl Säule) und Gelfiltration auf einer S300 (26/60) Säule bis zur Homogenität gereinigt (Leimkuhler and Rajagopalan, 2001). Da IscS als Cofaktor Pyridoxalphosphat benötigt, wurde das gereinigte und auf 3 mg/ml aufkonzentrierte Protein gegen 50 mM Tris/HCl, pH = 7,8, 200 mM NaCl, 2 mM DTT 150 µM Pyridoxalphosphat über Nacht dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde IscS bei -80°C gelagert.

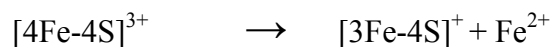
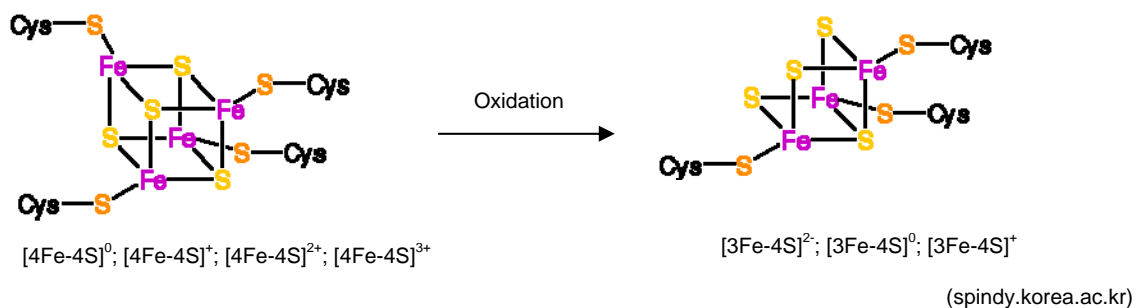
4.11.2 Klonierung und Reinigung von *pab* ABCE1 mit N-Terminalem Strep-Tag II

Über die *NdeI* und *NotI* – Restriktionsstelle konnte die kodierende Sequenz von *pab* ABCE1 in den Vektor pET-28 N-Strep gesetzt werden und anschließend mit dem Strep-tag II-Peptid als Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert werden. Strep-Tactin ist ein

genetisch verändertes Streptavidin, dadurch ist die Bindungsaffinität von Strep-tag II 100-mal höher als zu normalen Streptavidin. Nach Zellaufschluss und einem Hitzeschritt wurde das *pab* ABCE1 Protein über einen Anionenaustauschersäule vorgereinigt. Dieser Schritt war notwendig, da die Bindungsstellen von Strep-Tactin ansonsten irreversibel durch Biotin aus *E. coli* inhibitiert werden würden. Bei der anschließenden Affinitätschromatografie band das Strep-tag II-Fusionsprotein mit hoher Affinität an das immobilisierte Strep-Tactin. Zur Elution wurde Desthiobiotin verwendet. Als letzter Reinigungsschritt folgte eine Gelfiltration auf einer S300 (26/60) Säule.

4.11.3 Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster von *pab* ABCE1

In vielen Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen wird der [4Fe-4S] Cluster reversibel oxidiert und in einem zweiten Schritt durch Abgabe eines Eisen-Ions zu einem [3Fe-4S] Cluster stabilisiert (Abbildung 4.24). So enthält z.B. die inaktive Form der Aconitase einen [3Fe-4S] Cluster, umgekehrt erfolgt die Aktivierung durch die Aufnahme von Fe^{2+} in reduzierenden Bedingungen (Abbildung 4.26)



(Djaman et al., 2004)

Abbildung 4.24 **Oxidation von [4Fe-4S]- Clustern**

Eisen-Schwefel-Cluster können reversibel oxidiert werden und in einem zweiten Schritt durch Abgabe eines Eisen²⁺-Iones stabilisiert werden.

Durch den Zellaufschluss und die Reinigung an Luft, war das Protein oxidierenden Bedingungen ausgesetzt. Deshalb musste die FeS-Cluster unter reduzierenden Bedingungen rekonstituiert werden. Um das Protein nicht weiter dem Luftsauerstoff auszusetzen, wurden alle weiteren Schritte in einem anaeroben Zelt (Coy) durchgeführt (Abbildung 4.25). Das anaerobe Coy Zelt ist mit Formiergas (95% Stickstoff, 5% Wasserstoff) gefüllt und enthält nur 0-5 „parts per million“ (ppm) Sauerstoff: Diese Bedingungen können konstant gehalten werden, indem der Wasserstoff an Palladium-Katalysatoren mit eingebrachtem Luft-Sauerstoff zu Wasser reagiert. Um zu verhindern, dass im Puffer gelöster Sauerstoff die Reaktion beeinträchtigt, wurden alle verwendeten Puffer vor Verwendung eine Woche im Stickstoffzelt unter Rühren inkubiert. Der Puffer mit dem gelösten Protein wurde zusätzlich über eine Entsalzungssäule (Bio-Rad) mit sauerstofffreiem Puffer (50 mM Tris, pH 8,0, 200 mM NaCl, 5 mM DTT) ausgetauscht.



Abbildung 4.25 Alexandra Schele am anaeroben Stickstoffzelt

Im anaeroben Stickstoffzelt kann in sauerstofffreier Umgebung gearbeitet werden. Damit sind die Eisen-Schwefel-Cluster von ABCE1 vor Oxidation geschützt.

Zur Rekonstitution der FeS-Cluster wurden 1 ml der *pab* ABCE1 Proteinlösung (Proteinkonzentration 5 mg/ml) über Nacht bei 6°C mit 0,2 mM Pyridoxalphosphat, 2 mM L-Cystein, 2 mM FeCl₂, and 5 µM IscS inkubiert (Abbildung 4.26).

Um niedermolekulare Bestandteile nach der Reaktion zu entfernen, wurde die Lösung mit dem rekonstituierten Protein wiederum auf eine Entsalzungssäule (Bio-Rad) aufgetragen. Für die Kristallisation wurde die Proteinlösung auf 15 mg/ml konzentriert.

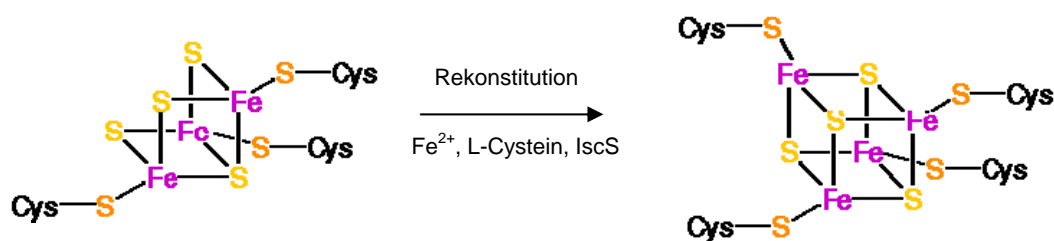


Abbildung 4.26 **Rekonstitution von [3Fe-4S]-Clustern mit IscS**

Mit Hilfe der Cystein Desulfurase IscS wird der durch die Oxidation inkomplette [3Fe-4S] Cluster zu einem [4Fe-4S] Cluster rekonstituiert.

4.11.4 Kristallisation, Datensammlung, Strukturbestimmung und Verfeinerung

Zur Kristallisation des Proteins *pab* ABCE1 (in 15 mg/ml in 50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT) wurden jeweils 2 μ l des gereinigten Proteins mit jeweils 2 μ l der Präzipitationslösung gemischt und bei Raumtemperatur mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode (sitzender Tropfen) konzentriert. Nach einigen Tagen konnten Proteinkristalle erhalten werden. Die Bedingung die zur Proteinkristallisation führten war

0.2 M Ca-Acetat, pH 7.3

20% PEG 3350

pab ABCE1 kristallisierte unter anaeroben Bedingungen im Komplex mit Magnesium²⁺-Ionen und ADP in der Raumgruppe $P4_32_12$ mit den Zellkonstanten $a = b = 63.2$ Å, $c = 319.38$ Å und einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Zum Einfrieren des Kristalls wurden dieser zwei Minuten in einem Stabilisierungspuffer (0.2 M Ca-Acetat, pH 7.3 and 20% PEG 3350, 20% Glycerin) inkubiert und danach in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ein nativer Datensatz wurde an der „Beamline“ PX („Swiss Light Source“, Villigen) bis zu einer Auflösung von 2,8 Å gesammelt. Datenprozessierung und –skalierung erfolgte mit XDS (Kabsch, 1993). Erste Phasen konnten mit Hilfe der einzigen Lösung nach molekularen Ersatz mit MOLREP, CNS (Brunger et al., 1998) ermittelt werden. Suchmodell für den molekularen Ersatz war *pab* ABCE1 Δ FeS.

Die zusätzliche Domäne mit den FeS-Clustern war deutlich in der $2F_o - F_c$ und in der $F_o - F_c$ Dichte zu erkennen (Abbildung 4.28). Manueller Einbau der FeS-Cluster Domäne (Reste 1-75) und Strukturverfeinerung erfolgte mit MAIN ((Turk, 1992). Als Modell für

die FeS-Cluster Domäne wurde das Protein 1FDX (2[4Fe-4S] Ferredoxin, PDB ID 1Dur) aus *Peptostreptococcus Asaccharolyticus* (Adman et al., 1973) verwendet. Phasenverbesserungen wurden mit CNS (Brunger et al., 1998) durchgeführt. Eine Zusammenstellung der kristallografischen Daten und der Verfeinerung enthält Tabelle 4.3. Das Proteinmodell enthielt alle 593 Reste, zwei Mg^{2+} -Ionen, zwei ADP, zwei [4Fe-4S]-Cluster, sowie 135 Wassermoleküle. Die gesamte Hauptkette sowie die Seitenketten waren eindeutig in der Elektronendichtekarte definiert. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit Procheck (Laskowski R. A., 1993) überprüft. Die Analyse der ϕ , Ψ -Dihedralenwinkel nach Ramachandran (Ramachandran, 1963) zeigten eine gute Stereochemie. 91,6% der Werte waren in der bevorzugten, 8,2% in der erlaubten und 0,0% waren in der verbotenen Region.

Tabelle 4.3 Zusammenstellung der kristallografische Daten und der Verfeinerung

Kristallografische Daten	
Kristallografische Daten	
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2
Einheitszelle (Å)	a=63.2, b=63.2, c=319.38, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Röntgenstrahlungsquelle	PX
Wellenlänge (Å)	0,9793
Auflösungsbereich (Å)	50-2,8
Gemessen	16308 (96,3%)
Reflexe im Test Set	796 (4,7%)
Vollständigkeit ^a (%) (letzte Schale)	97,5 (95,8%)
R _{symm} ^b (letzte Schale)	14,8 (50,4)
I/ σ I (letzte Schale)	15,21 (4,73)
Verfeinerung	
Auflösungsbereich (Å)	20-2,8
Reflexe F > 0 (Crossvalidierung)	811 (4,8%)
Lösungsmittelmoleküle	135
R ^c (R _{frei} ^d)	0.2089 (0,2772)
Standardabweichung Bindungslänge (Å)	0.008902
Standardabweichung Bindungswinkel (°)	1,138829
B-Faktor	47,6072 Å ²
% Kernbereich (nicht erlaubt) im Ramachandran	83% (0)

Blot	
^a Anomale Vollständigkeit. ^b R_{sym} ist der nicht gewichtete R Wert von I zwischen symmetrieverwandten Molekülen. ^c $R = \sum_{\text{hkl}} F_o(\text{hkl}) - F_c(\text{hkl}) / \sum_{\text{hkl}} F_o(\text{hkl}) $ für Reflexe des bearbeiteten Datensatzes ^d R_{frei} = der crossvalidierte R Faktor für 4,8% der Reflexe, die nicht mit verfeinert wurden	

4.12 Die Struktur von *pab* ABCE1

Das Proteinmodell von *pab* ABCE1 enthält 589 Aminosäuren. Das Protein hat eine Größe von ca. 80Å x 65Å x 50Å und besteht aus vier strukturellen Domänen (Abbildung 4.27):

- einer N-terminalen Eisen-Schwefel Domäne (FeS Domäne)
- zwei ABC ATPase typische NBD (NBD 1 und NBD 2)
- einer Scharnierregion (zusammengesetzt aus Hinge I +Hinge II)

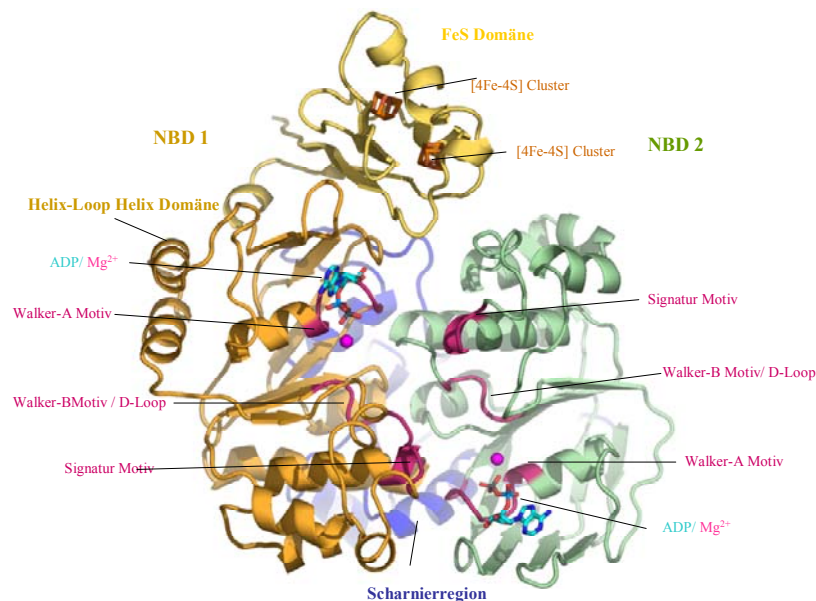


Abbildung 4.27 **Strukturübersicht von *pab* ABCE1**
pab ABCE1 besteht aus vier Domänen: der Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne (FeS-Domäne), den beiden Nukleotidbindungsdomänen (NBD 1 + NBD 2) und der Scharnierregion.

Die Beschreibung der beiden NBD und der Scharnierregion erfolgte ausführlich im Kapitel 4.6 und wird an dieser Stelle nur kurz zusammengefasst. Die drei Domänen NBD 1, NBD2 und die Scharnierregion formen eine Art „V“ mit einer Dimension von ca. 75 x 50 x 50 Å. NBD1 und NBD2 stehen zueinander in einer Kopf-zu-Fuß-Ausrichtung, wobei in dem Spalt zwischen den beiden NBD die beiden aktiven Zentren liegen. Verbunden werden die beiden NBD durch die Scharnierregion. Die aktiven Zentren werden aus dem Walker-A und Walker-B von NBD 1 und dem Signatur-Motiv von NBD 2, bzw. aus Walker-A und Walker-B von NBD 2 und dem Signatur-Motiv von NBD 1 gebildet. In der Kristallstruktur sind in beiden aktiven Zentren jeweils ein Mg^{2+} und ein ADP gebunden. Die Lage der beiden NBD zueinander entspricht der Lage der NBD in einer für ABC Enzyme typischen Form.

Einzigartig bei ABCE1 ist die aus ca. 75 Aminosäure bestehende N-terminale FeS Domäne. Sie enthält eine ferredoxinähnliche α/β -Faltung, wobei zwei α -Helices ein geknicktes, aus vier antiparallelen Strängen bestehendes β -Faltblatt einrahmen. Innerhalb der FeS Domäne liegen zwei cysteinreiche, konservierte Bereiche mit zwei 4-Eisen 4-Schwefel Clustern ([4Fe-4S]) (Abbildung 4.28).

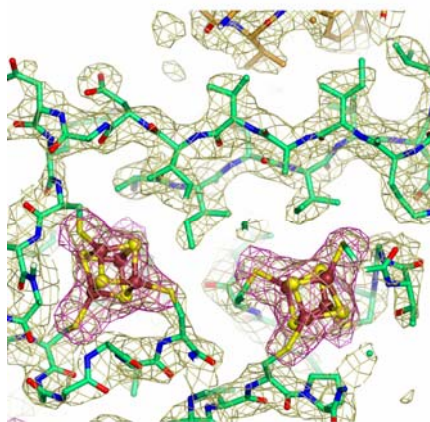


Abbildung 4.28 *Elektronendichte mit eingebautem Modell von pab ABCE1 und den beiden [4Fe-4S]-Clustern.*

Beide [4Fe-4S]-Cluster sind eindeutig in der Elektronendichte (rot) erkennbar. Sie bilden jeweils eine kubische Struktur, in dem jeweils vier Eisen-(rot) und vier Schwefelatome (gelb) alternierend die acht Ecken eines verdrehten Würfels bilden.

Der erste cysteinreiche Bereich (Cluster I) (CX₄CX₄CX₃C) ist in allen 40 ABCE1 Homologen, der zweite Bereich (Cluster II) (CX₂CX₂CX₃C) ist in 36 ABCE Proteinen konserviert (Kerr, 2004).

Beide [4Fe-4S]-Cluster sind eindeutig in der Elektronendichte erkennbar und werden von jeweils vier Cysteinen kovalent gebunden. Dabei wird der Cluster I durch die Cysteine 15, 20, 25 und 65 koordiniert, Cluster II durch die Cysteine 55, 58, 61 und 29. Sie bilden jeweils eine kubische Struktur, indem immer vier Eisen und vier Schwefel Atome abwechselnd die acht Ecken eines verdrehten Würfels besetzen.

4.13 Oxidation durch Luftsauerstoff

Die Kristallisation der archaealen ABCE1 Proteine war nach einer aeroben Reinigung ohne Rekonstitution nicht möglich. Ein Grund dafür könnte die Oxidation der in den FeS-Clustern gebundenen Eisenionen sein (siehe Abbildung 4.24). Um den Einfluss des Luftsauerstoffs auf den Oxidationszustand von *pab* ABCE1 zu messen, wurden Absorptionsspektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV-Vis) aufgenommen. Typisch für FeS-Cluster Proteine sind zusätzlich zum Proteinabsorptionsmaximum bei 280 nm eine Absorptionsschulter bei 320 nm und ein breiter Peak mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm (Lazazzera et al., 1996; Palmer, 19973).

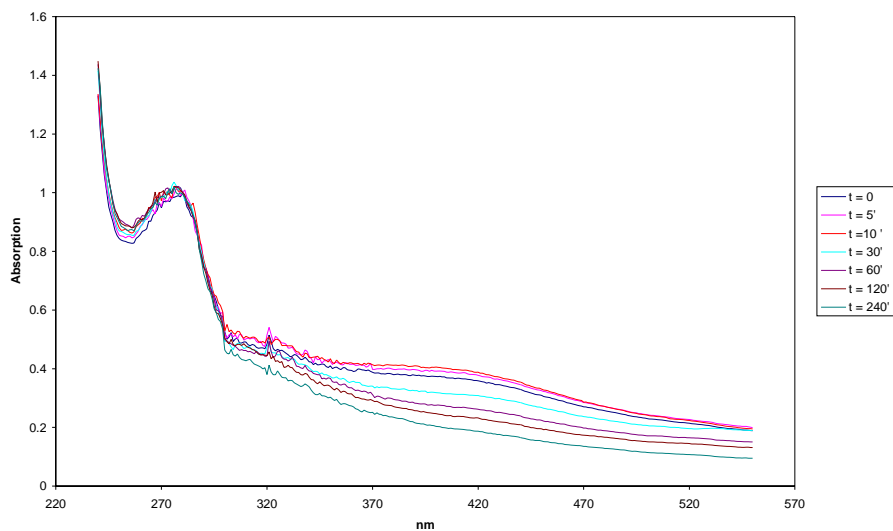


Abbildung 4.29 **Der Effekt von Sauerstoff auf das UV-Vis Spektrum von *pab* ABCE1.**
Die Abbildung enthält die Spektren von rekonstituierten *pab* ABCE1 (rot, $t = 0$) und 5', 10', 30', 60', 120', 240' und 24h nach der Exposition mit Sauerstoff.

Unter anaeroben Bedingungen absorbiert rekonstituiertes *pab* ABCE1 Strahlung im UV/Vis Bereich bei diesen Wellenlängen (Abbildung 4.29). Nach 30 Minuten Inkubation an Luftsauerstoff lässt sich ein Abfall der Absorption bei allen Wellenlängen beobachten, was durch Präzipitation des Proteins verursacht werden könnte. Nach 240 Minuten waren

die Absorptionsschulter bei 320 nm und das Absorptionsmaximum bei 420 nm komplett verschwunden. Diese Absorptionsabnahme im sichtbaren Bereich wird durch die Oxidation der 2[4Fe-4S]-Cluster bewirkt (siehe Kapitel 4.11.3 und Abbildung 4.24).

4.14 Expression des Proteins ABCE1 aus *S. cerevisiae* in Baculovirus infizierten Insektenzellen

Baculoviren sind filamentöse Viren mit doppelsträngiger DNA, die zur Erzeugung von komplexen eukaryotischen Proteinen in Zellkulturen verwendet werden können. Dazu wurde der ABCE1 ORF aus *S. cerevisiae* in den Vektor pFastBac™ des „Bac-to-Bac“® Systems (Invitrogen) kloniert. Mit diesem Plasmid wurden dann *E. coli* DH10 multibac Zellen transformiert. *E. coli* DH10 multibac Zellen enthalten ein „Eltern Bacmid“, mit einer lacZ-mini-attTN7 Fusion. Mit Hilfe eines Transpositionsproteins, das den Zellen mit einem Helfer Plasmid zugeführt wird, kann Transposition zwischen den Elementen des pFastBac™ Vektors und dem Eltern Bacmid stattfinden. Das Gen wird in die LacZ Region integriert, so dass das gewünschte Bacmid über mit blau/ weiß Selektion erkannt werden kann. Nach zwei Tagen konnte aus den selektierten, weißen Zellen die Bacmid DNA isoliert werden und damit Sf21 Insektenzellen mit Hilfe von „Cellfectin transfection reagent“ infiziert werden. Nach vier Tagen enthielt der Zellüberstand amplifizierte, rekombinante Baculovirus. Der Überstand wurde geerntet und dazu verwendet, neue Sf21 Zellen zu infizieren. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Das überexprimierte, rekombinante ABCE1 Protein konnte mit einem spezifischen Antikörper in einem Western Blot nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Sf21 Zellen mitgeblottet, als Positivkontrolle dienten *S. cerevisiae* Zellen mit endogenen ABCE1. Mit Hilfe des verwendeten Antikörpers konnte gezeigt werden, dass ABCE1 aus *S. cerevisiae* in Sf21 Zellen überexprimiert werden kann. Das erhaltene Protein ABCE1 konnte bisher nicht gereinigt werden. Auswertungen deuten darauf hin, dass das Protein unlöslich exprimiert wird oder nach Zellaufschluss präzipitiert.

4.15 Zusammenfassung der Ergebnisse mit rekombinanten Proteinen

Für die vorliegende Arbeit wurden ABCE1 Proteine aus verschiedenen Organismen verwendet. Eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte und deren Mutanten und die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.4 dargestellt. Ein Teil der Mutanten wurden von Katharina Büttner im Rahmen ihrer Diplom- und Doktorarbeit (Buettner, 2003) hergestellt und werden in der Tabelle mit (KB) gekennzeichnet.

Tabelle 4.4 Zusammenstellung der verwendeten Konstrukte

Name	Konstrukt	Ergebnis	Raumgruppe	M./ a. E. ^{a)}	Einheitszelle (Å)
<i>pfu</i> ABCE1	Volllänge	Keine Kristalle			
<i>pfu</i> ABCE1 N1	Δ 1-30	Keine Kristalle			
<i>pfu</i> ABCE1 N2	Δ 1-83	Kristalle	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	2	a=70,29, b=101,67, c=188,27
<i>pfu</i> ABCE1 N1C (KB) E236Q (KB) E479Q (KB) E236Q-E479Q (KB)	Δ 1-63	Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression			
<i>pfu</i> ABCE1 N1b = <i>pfu</i> ABCE1 Δ FeS	Δ 1-71	Kristalle	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	a=59,68, b=74,64, c=123,69
<i>pfu</i> FeS (KB)	1-63	Unlöslich in <i>E. coli</i>			
<i>afu</i> ABCE1	Volllänge	Keine Kristalle			
<i>h</i> ABCE1	Volllänge	Keine Expression, Fehler in cDNA			
<i>h</i> ABCE1 Δ FeS	Δ 1-74-	Keine Expression, Fehler in cDNA			
<i>pab</i> ABCE1 R304E E240Q E483Q K443A Y244F Y244F-E483Q E240Q-Y244F E240Q-Y244F-E483Q S216A (KB) D274N (KB) R304K-K443A (KB)	Volllänge	Kristalle Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression Gute Expression	P4 ₃ 2 ₁ 2	1	a=63.2, b=63.2, c=319.38, $\alpha=\beta=\gamma=90$
<i>pab</i> ABCE1 Δ FeS	Δ 1-74	Kristalle,	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	a=59,80, b=62,43, c=147,27
Y244F		Kristalle	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	a=60,65, b=62,95, c=151,16
Y244F-E483Q		Gute Expression			

E240Q-Y244F-E483Q		Kristalle	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	a=86,52, b=83,34, c=153,73
S216A (KB)		Kristalle	P3 ₂	1	a=98,460, b=98,460, c=133,502, $\alpha=\beta=90,00^\circ$, $\gamma=120,00^\circ$
<i>sso</i> ABCE1	Volllänge	Schlechte Expression			
<i>sso</i> ABCE1 Δ FeS S234R S481R S234R-S481R	Δ 1-74	Kristalle Gute Expression Gute Expression Gute Expression	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1	
<i>y</i> ABCE1	Volllänge	Schlechte Expression in <i>E. coli</i> , unlöslich in Insektenzellen			
<i>y</i> ABCE1 Δ FeS	Δ 1-73	Schlechte Expression in <i>E. coli</i> , unlöslich in Insektenzellen			
<i>Methanosarcina</i>	Volllänge	Schlechte Expression			
<i>Methanosarcina</i> Δ FeS	Δ 1-74	Schlechte Expression			

^{a)} M./ a. E.: Moleküle/ asymmetrische Einheit

4.16 Mutationen in Kollaboration mit Birgit Märtens (Genzentrum, München)

Obwohl ABCE1 in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde, ist die genaue zelluläre Funktion nicht bekannt. Um die aus der Struktur erhaltenen Ergebnisse experimentell zu testen und Auswirkungen auf die Zelle *in vivo* zu untersuchen, wurden konservierte oder strukturell wichtige Motive von ABCE1 von Birgit Märtens in *S. cerevisiae* analysiert. Dazu musste das endogene ABCE1 Gen von *S. cerevisiae* deletiert und durch das ABCE1 Gen auf einem Plasmid, kontrolliert durch den endogenen Promoter, ersetzt werden. Mit Hilfe eines Komplementationassays konnten die Auswirkungen von Mutationen in den funktionellen Motiven *in vivo* getestet werden.

Tabelle 4.5

Mutationen in ABCE1 aus *S. cerevisiae*

In der ersten Spalte wird die Aminosäure, die Sequenznummer in *S. cerevisiae* und die eingeführte Punktmutation beschrieben, die Spalte lebensfähig gibt an, ob *S. cerevisiae* durch die Mutation noch lebensfähig (+) oder nicht mehr lebensfähig (-) ist. Die 3. Spalte gibt die strukturelle Position der Mutation im Protein an.

Mutation	Lebensfähig	Domäne/ Position
K19, K20	+	FeS Domäne
C29A	+	FeS Domäne/ Cluster II
C65A	-	FeS Domäne/ Cluster I
C29A, C65A	-	FeS Domäne/ Cluster I + II
K35A	+	FeS Domäne/ Insertion 2
K63A	+	FeS Domäne
K64A	+	FeS Domäne
K116A	-	Walker A/ NBD 1
K116W	-	Walker A/ NBD 1
P129S	+	N-Terminus der Helix-Loop Helix Domäne
R148A	+	Helix-Loop Helix Domäne
L152A	+	Helix-Loop Helix Domäne
Q171A	-	Q-Loop/ NBD 1
L190A	+	NBD 1
E196Q	+	NBD 1
Q210I	+	NBD 1
S223R	-	Signature/ NBD 1
E247Q	-	Walker B/ NBD 1
R265E	+	NBD 1
R311E	-	Hinge I
R328E	+	Hinge I
Q346R	+	Linker Hinge I zu NBD2
T389A	+	Walker A/ NBD 2
K391A	-	Walker A/ NBD 2
Q420A	-	Q Loop/ NBD 2
I422V	+	Strukturell divers/ NBD 2
T429E	+	Strukturell divers/ NBD 2
R431A	+	Strukturell divers/ NBD 2
L433A	+	Strukturell divers/ NBD 2
K453Q	+	Strukturell divers/ NBD 2
K453A	-	Strukturell divers/ NBD 2
D462A	+	Strukturell divers/ NBD 2
E464Q	+	Strukturell divers/ NBD 2
V465A	+	NBD 2
S469R	-	Signature/ NBD 2
E493Q	-	Walker B/ NBD 2
P494N	+	Walker B/ NBD 2
R573E	-	Hinge 2
P576S	+	Hinge 2
R580A	+	Hinge 2
P581A	+	Hinge 2
R582A	+	Hinge 2
I583A	+	Hinge 2
N584A	+	Hinge 2
K585A	+	Hinge 2
L586A	+	Hinge 2
D587A	+	Hinge 2
S588E	-	Hinge 2
Q589A	+	Hinge 2
D591A	+	Hinge 2
K592A	+	Hinge 2
E593Q	+	Hinge 2
Q594E	+	Hinge 2
K595A	+	Hinge 2
S596A	+	Hinge 2
S597A	+	Hinge 2
G598A	+	Hinge 2
N599A	+	Hinge 2

Die Mutationen hatten allerdings nur zwei Auswirkungen: Die Zellen zeigten entweder keinen Phänotyp, oder sie waren nicht lebensfähig (Tabelle 4.5). Essentielle Aminosäuren befinden sich vor allem in den Motiven der beiden aktiven Zentren, (siehe auch (Dong et al., 2004), im FeS-Cluster, in der Hinge I und II Domäne und in der strukturell diversen Region (siehe Abbildungen 4.30, 4.31).

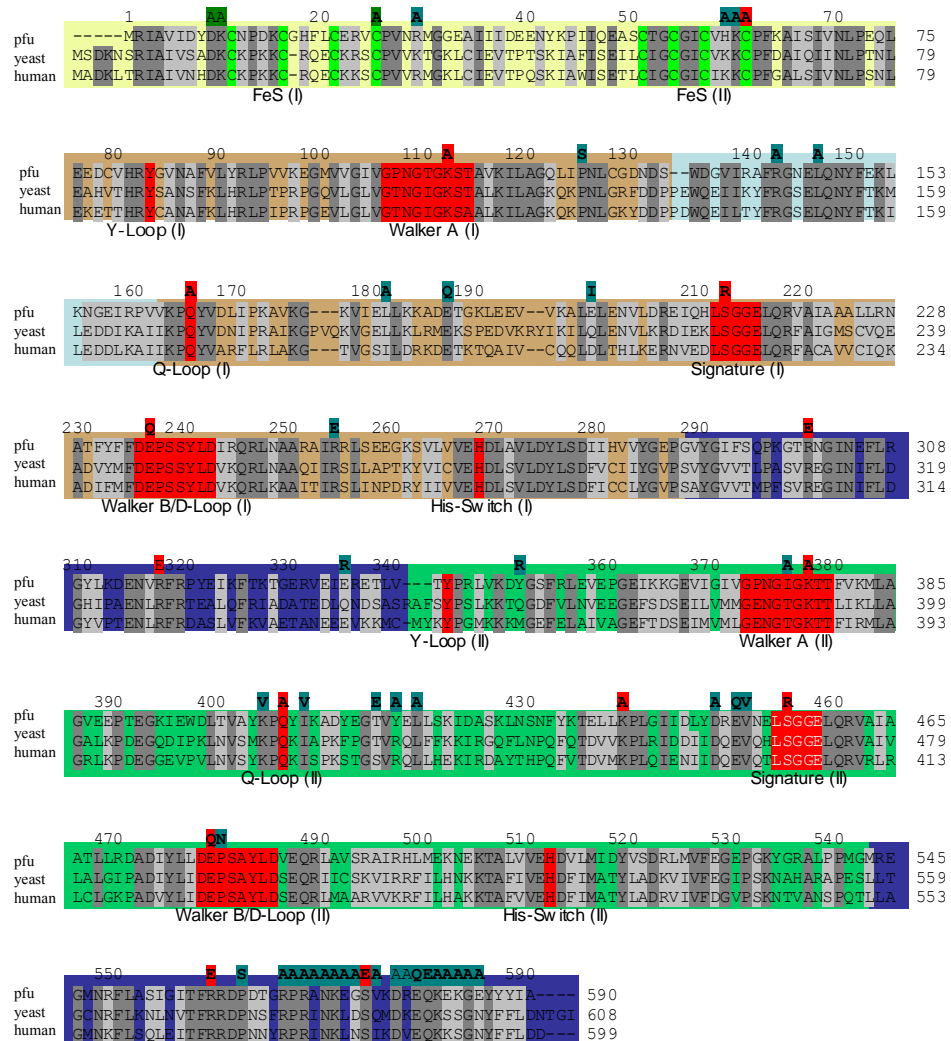


Abbildung 4.30 Sequenzvergleich zur Verdeutlichung der Positionen der eingeführten Mutationen
Sequenzvergleich von pfu, *S. cerevisiae* und humanem ABCE1. Mutationen die in *S. cerevisiae* nicht lebensfähig waren sind rot unterlegt. Mutationen, die keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* hatten sind grün. Die farbliche Unterlegung der Domänen entspricht den Farben in den Strukturabbildungen (braun, NBD 1; grün, NBD2; gelb, FeS Domäne; blau, Scharnierregion; hellblau, HLH Domäne). Die Motive, die an der Nukleotidbindung beteiligt sind wurden rot hinterlegt.

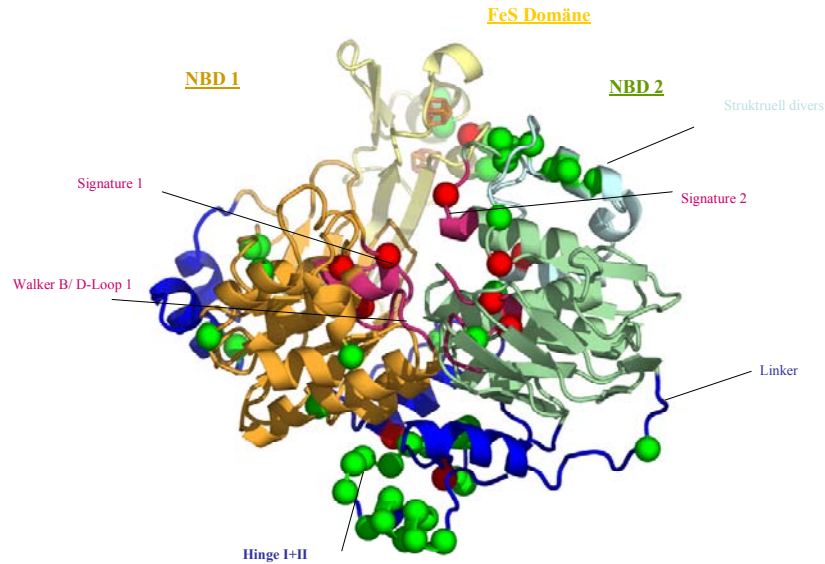


Abbildung 4.16 Strukturmodell von pab ABCE1 zur Veranschaulichung der Positionen der eingeführten Mutationen
 Strukturmodell von pab ABCE1, in dem die Mutationen aus *S. cerevisiae* gekennzeichnet sind. (Links, Ansicht von oben; rechts, von der Seite. Mutationen, die in *S. cerevisiae* nicht lebensfähig waren sind mit einem roten Ball gekennzeichnet, Lebendmutanten mit einem grünen Ball (braun, NBD 1; grün, NBD2; gelb, FeS Domän; blau, HLH Domäne und Scharnierregion).

Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse der eingebrachten Mutationen erfolgt in Kapitel 5.

5. Diskussion

5.1 Konservierung von ABCE1

ABCE1 ist ein Mitglied der „ATP binding cassette“ (ABC) Proteinfamilie. Es ist ein in der Evolution außergewöhnlich hoch konserviertes und in allen getesteten Organismen essentielles Protein (Kamath et al., 2003; Winzeler et al., 1999). Kopien von ABCE1 wurden nur in Archaeen und Eukaryoten gefunden, in Eubakterien sind keine Homologe bekannt. Eine Datenbanksuche im Jahre 2004 ergab 22 ABCE1 Homologe in Eukaryoten und 18 homologe Sequenzen in Archaeen (Kerr, 2004). Heute ist durch die vielen neu sequenzierten Genome bekannt, dass ABCE1 Homologe in allen sequenzierten Eukaryoten und in allen drei Gruppen der Archaeen vorkommen. Vergleicht man die Sequenzen von ABCE1 Proteinen aus Archaeen und Eukaryoten, so findet man eine sehr hohe Sequenzidentität. So besteht z.B. zwischen *Pyrococcus abyssi* und *Saccharomyces cerevisiae* eine Sequenzidentität von 45,4%, zwischen *Pyrococcus abyssi* und *Homo sapiens* 44,0%. Zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens* liegt die Sequenzidentität sogar bei 67,1%. Ein ausführlicher Sequenzvergleich mit Sequenzidentitäten befindet sich im Anhang. Bei einem Vergleich aller Proteine findet man ABCE1 zwischen Archaeen und *Saccharomyces cerevisiae* unter den fünf am meisten konservierten Proteinen. Eine vergleichbar hohe Konservierung hat z.B. die große Untereinheit der RNA Polymerase. Bei einem Vergleich zwischen dem Genom des Archaeen *Methanococcus jannaschii* und des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* ist es sogar das am zweitstärksten konservierte Protein (K.P: Hopfner persönliche Auskunft). Eine so hohe Konservierung und die essentielle Eigenschaft deuten auf eine wichtige biologische Funktion von ABCE1 hin. Obwohl in den letzten Jahren viel an ABCE1 gearbeitet wurde, ist die genaue zelluläre Funktion nicht bekannt.

Im Gegensatz zu allen bisher bekannten ABC ATPasen enthält ABCE1 neben den für die Familie charakteristischen Nukleotidbindungsdomänen (NBD 1 und NBD 2) drei weitere, für ABC ATPasen einzigartige Domänen. Eine Eisen-Schwefel-Cluster Domäne (FeS Domäne), eine kleine Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne und eine Scharnierregion (zusammengesetzt aus Hinge I + Hinge II). NBD 1, NBD 2 und die Scharnierregion bilden zusammen eine „V-förmige“ Struktur. Die N-terminale FeS und die Helix-Loop-

Helix Domänen befinden sich in der Struktur seitlich der NBD 1 (Abbildung 5.1). Die Orientierung der NBD von ABCE1 ist ähnlich der bei anderen Mitgliedern der ABC ATPase Familie. Die Position der drei anderen Domänen ist bei ABCE1 neuartig. Ihre Struktur-Funktionsbeziehungen werden im weiteren Teil der Arbeit diskutiert.

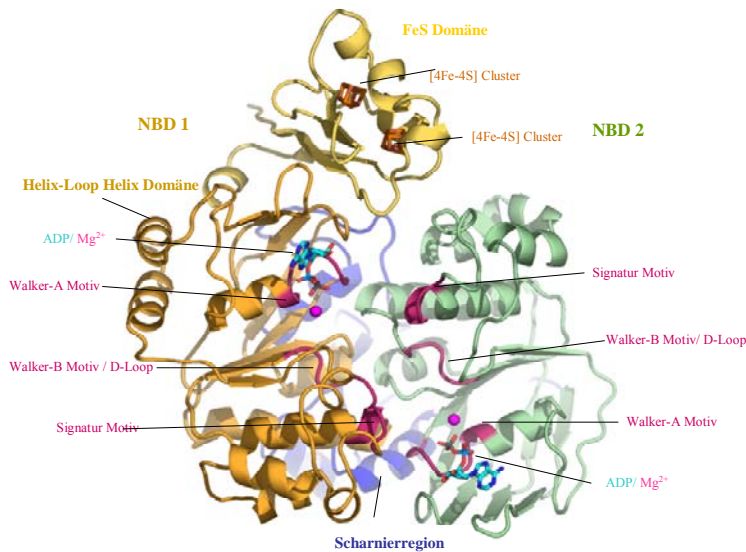


Abbildung 5.1 Strukturübersicht von pab ABCE1
 pab ABCE1 besteht aus fünf Domänen: der Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne (FeS Domäne), den beiden Nukleotidbindungsdomänen (NBD 1 + NBD 2) und der Scharnierregion. Die Helix-Loop-Helix Domäne liegt seitlich der NBD 1.

5.2 Die Eisen-Schwefel-Cluster Domäne

ABCE1 ist ein vor allem zytoplasmatisches Protein, das am N-Terminus zwei cysteinreiche Regionen enthält. Diese Domäne hat hohe Ähnlichkeit mit der Eisen-Schwefel (FeS) Bindedomäne von Ferredoxinen. Ferredoxine sind kleine Proteine, die in vielen metabolischen Prozessen Elektronen transportieren. Je nach Aufbau der Eisen-Schwefel-Cluster bilden sie verschiedene Untergruppen. Eine große Untergruppe, welche zuerst in Bakterien entdeckt wurde, sind die bakteriotypischen Ferredoxine. In dieser Gruppe wird das aktive Zentrum aus einem 4-Eisen-4-Schwefel ([4Fe-4S])-Cluster gebildet. Während der Evolution haben sich die bakteriotypischen Ferredoxine verändert, so bildeten sich durch Genduplikationen, Transpositionen und Fusionen Proteine mit multiplen Eisen-Schwefel Zentren, z.B. der Diclustertyp ($2 \times [4\text{Fe-4S}]$) wie bei ABCE1, Polyferredoxine und Eisen-Schwefel Untereinheiten in großen Proteinen (z.B. bakterielle

Succinatdehydrogenase/ Fumaratereduktase; Formathydrogenlyase und Formatdehydrogenase Komplexe; die Pyruvate-Flavodoxin Oxidoreduktase; NADH Ubiquinon Reduktase u.a.). Die bakteriotypische Ferredoxin Familie mit zwei [4Fe-4S]-Clustern ist weitverbreitet, tritt aber vor allem bei Bakterien und Archaeen auf. Kleine Ferredoxine findet man bei Eukaryoten nicht, das charakteristische Strukturmotiv ist aber oft eine Domäne von großen Metalloenzymen. Beispiele für Metalloenzyme mit zwei [4Fe-4S]-Clustern sind Hydrogenasen, Dimethylsulfoxidreduktasen, das Photosystem I und der Respiratorische Komplex I. In allen diesen Enzymen ist der vektorielle (gerichtete) Elektronen Transfer zwischen den beiden Clustern ein essentieller Teil des Gesamtmechanismus des Enzyms. Proteine, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, können außer Elektronentransport noch andere Funktionen haben. Beispiele dafür sind Katalyse, Regulation der Genexpression oder Enzymaktivität, Sauerstoff- und Eisensensoren sowie die Erzeugung und Stabilisierung von Radikalen (Giastas et al., 2006).

5.2.1 Die Struktur der Eisen-Schwefel-Cluster-Domäne von ABCE1

In allen bekannten 3D Strukturen von bakteriotypischen Ferredoxinen haben die [4Fe-4S]-Cluster die gleiche Anordnung zueinander und eine für den Elektronentransport relevante Abstand (12 Å Zentrum zu Zentrum, 6 Å Ecke zu Ecke). Ferredoxine sind deshalb Redoxmediatoren zwischen elektronenspendenden und elektronenverwendenden Enzymen, indem sie Elektronen weiterleiten. Vergleicht man Aminosäuresequenzen von bakteriotypischen Ferredoxinen, so gibt es zwei Unterfamilien (Giastas et al., 2006): Die erste Unterfamilie wird durch Proteine aus Clostridien repräsentiert. Mitglieder dieser Familie bestehen aus 55-61 Aminosäuren und beide Eisen-Schwefel (FeS)-Cluster sind durch zwei CXXCXXC..CP Motive an das Protein gebunden. Die Redoxpotentiale von Cluster I und II, liegen bei ca. -400 mV. Mitglieder der zweiten Unterfamilie bestehen aus ca. 82 Aminosäuren und haben eine charakteristische Insertion aus 6 Aminosäuren zwischen dem 2. und 3. Cystein des Clusters II. Die Redoxpotentiale, gemessen gegen die Normalwasserstoffelektrode, haben sehr negative und stark unterschiedliche Werte (-585 mV bis -675mV für Cluster I und -420 mV bis -485 mV für Cluster II) (Giastas et al., 2006).

Überlagert man die N-terminalen Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) Domänen (Aminosäuren 1-75 von *pab* ABCE1) mit FDX 2(4Fe-4S) Ferredoxin aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (PDB ID 1Dur, (Adman et al., 1973), einem Repräsentanten der Unterfamilie 1) so lässt sich eine hohe strukturelle Übereinstimmung erkennen (Abbildung 5.2). Der Abstand zwischen den beiden FeS-Clustern beträgt bei *pab* ABCE1 - wie bei anderen Ferredoxinen - ca. 12 Å (Zentrum zu Zentrum) und hat damit mit hoher Wahrscheinlichkeit eine elektronenleitende Funktion.

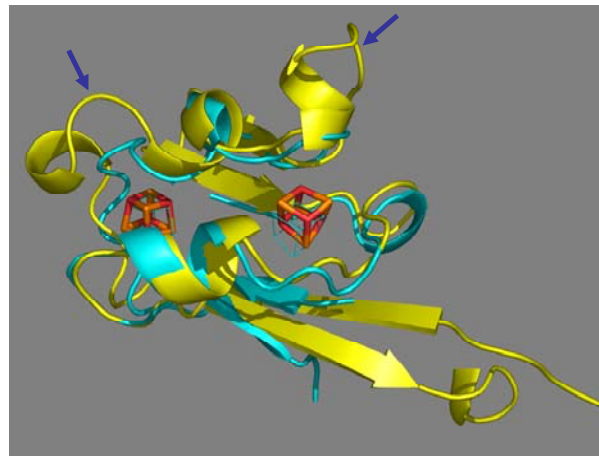


Abbildung 5.2 Überlagerung der Hauptketten der Eisen-Schwefel-Cluster Domänen von *pab* ABCE1 und FDX 2(4Fe-4S) Ferredoxin.
 Die FeS-Cluster Domänen von *pab* ABCE1 (gelb) und FDX 2(4Fe-4S) Ferredoxin aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (cyan) (PDB ID 1Dur, (Adman et al., 1973) zeigen hohe strukturelle Übereinstimmung. Zusätzliche Loops von ABCE1 wurden mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet.

Um Aussagen über die Funktion der FeS Domäne von ABCE1 zu ermöglichen, wurde mit Hilfe einer DALI Suche (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>, (Holm and Sander, 1993) in der Protein Daten Bank („Worldwide Protein Data bank“) die FeS Domäne (Aminosäure 1-85) von *pab* ABCE1 mit FeS Domänen von anderen Proteinen verglichen. Die höchsten strukturellen Gemeinsamkeiten zeigte *pab* ABCE1 mit der Oxireduktase Adenylylsulfat Reduktase (PDB ID: 1JNR) aus *Archaeoglobus fulgidus* (Fritz et al., 2002). Ferredoxine befinden sich auf den Plätzen 2,3,6,7 und 8, wobei ein Ferredoxin aus *Clostridium* (PDB ID 1FDN) aus der Unterfamilie 1 auf dem 2. Platz steht. Ein Sequenzvergleich zwischen einem Mitglied der 1. Unterfamilie (PDB ID 1DUR), einem Mitglied der 2. Unterfamilie (PDB ID: 2FGO) und *pab* ABCE1 zeigt, dass bei ABCE1 die charakteristische Insertion der 2. Unterfamilie fehlt (Abbildung 5.3). Die

FeS Domäne von ABCE1 ist deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Mitglied der Unterfamilie 1 der bakteriotypischen Ferredoxine. Die Strukturüberlagerung von *pab* ABCE1 und dem Ferredoxin der 1. Unterfamilie (Abbildung 5.2) und der Sequenzvergleich zwischen verschiedenen ferredoxinähnlichen FeS Domänen zeigen weiter, dass ABCE1 an zwei Positionen zusätzliche Loops (Insertion 1 und Insertion 2) enthält (siehe Abbildungen 5.2 und 5.3).

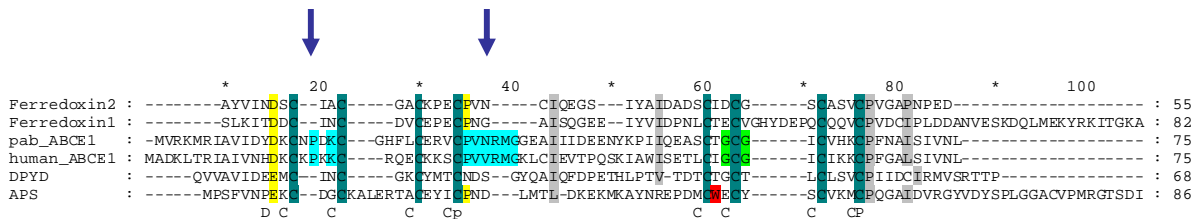


Abbildung 5.3 Sequenzvergleich zwischen Ferredoxinen, ferredoxinähnlichen Domänen und ABCE1
 Ein Sequenzvergleich zwischen den Ferredoxinen der 1. Unterfamilie (1 DUR) und der 2. Unterfamilie (2FGO), *pab* ABCE1, humanem ABCE1, der Dipyrimidinhydrogenase (DPYD, PDB ID 1H7W) und der Oxireduktase Adenylylsulfat Reduktase (APS, PDB ID 1JNR), zeigt, dass ABCE1 zwar hohe Homologie (konservierte Cysteine, dunkelgrün) zu Ferredoxinen hat, aber zusätzliche Insertionen enthält (cyan und blaue Pfeile). Konservierte Reste sind gelb und grau dargestellt, das für den Elektronentransport von APS wichtige Tryptophan ist rot unterlegt.

Die Insertion 1 wird von zwei zusätzlichen Aminosäuren (Reste P17^{pab}, K19^{pab}) gebildet, die sich in der Sequenz zwischen dem 1. und dem 2. Cystein des Clusters I befinden. Das Prolin ist bei allen bekannten ABCE1 Proteinen konserviert. An Position 19^{pab} befindet sich meistens ein Lysin, kann aber in seltenen Fällen auch ein Arginin oder eine Aminosäure mit einer NH₂-haltigen Seitenkette (Glutamin, Asparigin) sein. Die Aminosäure mit der funktionellen NH₂-Gruppe ist dabei so positioniert, dass es zur strukturell diversen Region zeigt (Abbildung 5.4, B), allerdings ist die Mutation K19A^{yeast}, K20A^{yeast} in *S. cerevisiae* ohne Phänotyp. Vergleicht man die Struktur von *pab* ABCE1 mit der Oxireduktase Adenylylsulfat Reduktase (APS, PDB ID 1JNR) aus *Archaeoglobus fulgidus* (Fritz et al., 2002), so enthält APS in der 3D Struktur an einer ähnlichen Stelle eine Insertion (Aminosäuren K14^{APS} bis R18^{APS}), obwohl diese in der Sequenz zwischen dem 2. und 3. Cystein des Cluster I ist (Abbildung 5.4, A).

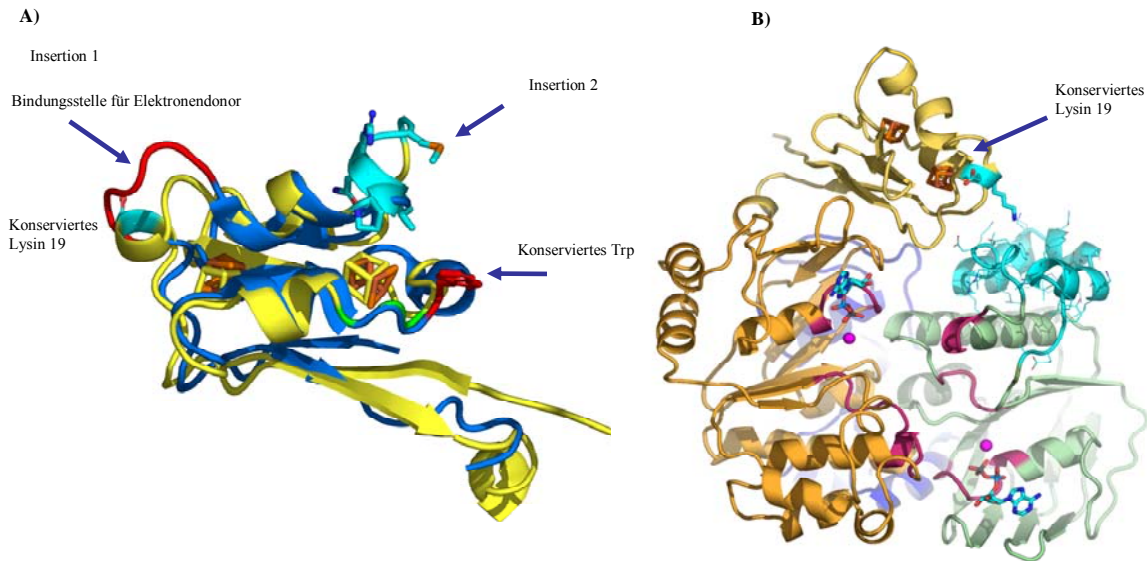


Abbildung 5.4 Die Eisen-Schwefel-Cluster Domäne von pab ABCE1 enthält konservierte Reste und Insertionen

A) Überlagerung der Hauptketten von pab ABCE1 (gelb) mit der Struktur einer der ferredoxinähnlichen FeS Domänen der Oxireduktase Adenylylsulfat Reduktase (APS, PDB ID 1JNR) aus Archaeoglobus fulgidus (blau) (Fritz et al., 2002). Beide Proteine enthalten einen Loop (Insertion 1 bei ABCE1, rot), der bei APS Reduktasen die Bindungsstelle für den Elektronendonator ist. Über ein konserviertes Tryptophan (rot) gelangen die Elektronen in den FeS-Cluster von APS. pab ABCE1 enthält im Vergleich mit APS und anderen Ferredoxinen noch eine zweite konservierte Insertion (Insertion 2, cyan). Weitere Proteindomänen von pab ABCE1 und der APS wurden zur Vereinfachung weggelassen.

B) Ein konserviertes Lysin (K19) von pab ABCE1 ist so positioniert, dass es zur strukturell diversen Region zeigt (FeS Domäne, gelb; NBD 1; braun; NBD 2, gelb; Hinge, grün; K19 und strukturell diverse Region, cyan; aktives Zentrum, pink).

Innerhalb der APS Reduktasen ist dieser Loop bei Schwefel-reduzierenden Organismen hoch konserviert. Er bildet wahrscheinlich die Bindungsstelle für den physiologischen Elektronendonator und variiert je nach Redoxpartner (Fritz et al., 2002). Der zweite zusätzliche Loop von ABCE1 in der FeS Domäne (Insertion 2, Aminosäure 30-36^{pab}) befindet sich zwischen den beiden FeS-Clustern. Die Länge der Insertion ist innerhalb von ABCE1 konserviert. Dabei ist immer die vierte Aminosäure nach Cystein 4 eine basische Aminosäure (K34^{yeast} bzw. R^{pfu, human}, siehe Sequenzvergleich, Anhang). Die

darauffolgende Aminosäure ist häufig ein Methionin (M34^{pab}). Methionine befinden sich in der Regel selten an Proteinoberflächen. In einer Kollaboration mit Birgit Märten, Genzentrum Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen, wurde die konservierte basische Aminosäure K34^{yeast} aus *S. cerevisiae* durch ein Alanin ersetzt. Die erhaltene Mutante zeigte keinen Phänotyp. Vergleicht man die Lage der Insertion 2 in der FeS Domäne mit der Position der Elektronenakzeptorseite von APS (Fritz et al., 2002), so fällt auf, dass bei APS in direkter Nachbarschaft ein konserviertes Tryptophan liegt (Abbildung 5.4). Bei APS werden Elektronen über dieses konservierte Tryptophan zum Elektronenakzeptor FAD geleitet (Fritz et al., 2002). Bei ABCE1 könnte daher die Insertion 2 eine mögliche Interaktionsstelle für einen Elektronenakzeptor bilden. Da die K34A^{yeast} Mutante in ABCE1 aus *S. cerevisiae* keinen Phänotyp zeigte, müsste diese potentielle Elektronenakzeptorstelle in weiteren Mutagenesen auf die Funktionsfähigkeit des Proteins getestet werden. Dabei wäre es sinnvoll den Rest K34^{yeast} nicht durch die kleine Aminosäure Alanin sondern durch andere, vor allem negativ geladenen Aminosäuren zu ersetzen.

Um die theoretische Lage der Elektronendonator und –akzeptorbindungstelle genauer zu bestimmen wurde die Struktur von *pab* ABCE1 noch zusätzlich mit der Struktur einer ferredoxinähnlichen FeS Domäne von Dihydropyrimidinehydrogenase (DPYD, PDB ID 1H7W) (Dobritzsch et al., 2001) aus Schweineleber (*Sus scrofa*, Wildschwein) und deren Cofaktoren verglichen (Abbildung 5.5). Die DPYD besteht aus fünf Domänen, wobei das Homodimer 2 FAD, 2 FMN und 8[4Fe-4S]-Cluster enthält. In der DPYD gelangen die Elektronen von dem Elektronendonator NADPH₂, der an den Cofaktor FAD gebunden ist, über eine neuartige 2 [4Fe-4S] Domäne zu der ferredoxinähnlichen 2 [4Fe-4S]-Cluster Domäne (Abbildung 5.9, rosa). Von dort gelangen die Elektronen dann über den 1. FeS-Cluster und über den 2. FeS-Cluster zu FMN, das den Cofaktor für den Elektronenakzeptor (Thymin oder Uracil) bildet (Dobritzsch et al., 2001).

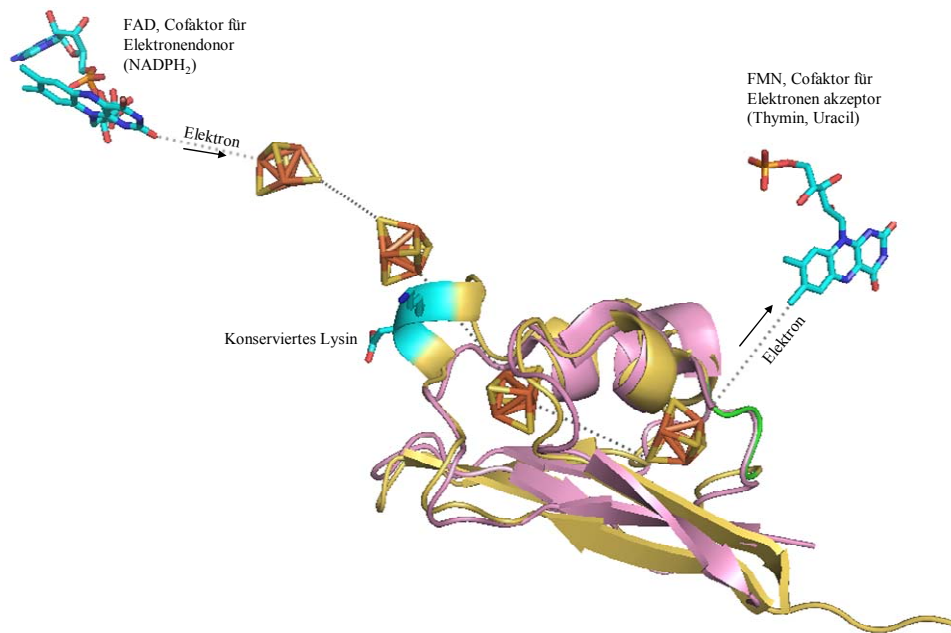


Abbildung 5.5 Weg der Elektronen in der Dihydropyrimidindehydrogenase (DPYD)
 Überlagerung der Hauptketten der Modelle der Proteinstruktur von *pab* ABCE1 (gelb) und dem Modell der Proteinstruktur einer ferredoxinähnlichen FeS Domäne der DPYD (PDB ID 1H7W) (Dobritzsch et al., 2001) aus Schweineleber und deren Cofaktoren (rosa). Weitere Proteindomänen von *pab* ABCE1 und der DPYD wurden zur Vereinfachung weggelassen. Die in weiteren Domänen der DPYD gebundenen Cofaktoren sind zur Darstellung des Elektronenweges abgebildet.

Sowohl die Stelle des Elektroneneintritts als auch die Stelle des Elektronenaustritts sind strukturell bei der DPYD und APS gleich positioniert. Dabei wird die Elektroneneintrittsstelle bei APS durch den konservierten Loop K14^{APS} bis R18^{APS} gebildet. Bei *pab* ABCE1 entspricht diese Stelle der Insertion 1 mit den konservierten Aminosäuren Prolin und Lysin (P17^{pab}, K19^{pab}). Um die FeS-Cluster von APS zu verlassen, werden die Elektronen über ein konserviertes Tryptophan (Abbildung 5.3, rot) zum Elektronenakzeptor FAD geleitet (Fritz et al., 2002). Falls ABCE1 Elektronen transportiert, was durch die nicht lebensfähigen Mutanten der Cysteine vermutet wird, könnte die Elektronenaustrittsstelle ein Loop mit der konservierten Sequenz (G56^{pab}, C57^{pab}, G58^{pab}, Abbildungen 5.4 und 5.5, grün) sein. Dieser Loop ist strukturell gleich positioniert wie das konservierte Tryptophan von APS. Wie bei den meisten 2[4Fe-4S] Ferredoxinen ist auch bei ABCE1 das 3. Cystein (C58^{pab}) des FeS-Clusters II das am stärksten nach außen exponierte Atom des Clusters. Dadurch ist der Schwefel dieses

Cysteins am ehesten von außen für den Elektronentransfer zugänglich. Da diese Position auch strukturell der Elektronenaustrittsstelle der DPYD entspricht, könnte hier eine Stelle für den Elektronenaustritt sein, falls ein Elektronentransport bei ABCE1 für die Funktion wichtig ist.

Bei ABCE1 könnte ein bisher unbekannter physiologischer Elektronendonator an die strukturell diverse Region binden. Das Elektron könnte über die Insertion I und die beiden FeS-Cluster geleitet werden. Ein unbekannter Elektronenakzeptor, der an die Insertion II bindet, könnte das Elektron über die konservierte Sequenz (G56^{pab}, C57^{pab}, G58^{pab}, Abbildung 5.5, grün) von den FeS-Clustern wieder aufnehmen.

5.2.2 Konservierte Aminosäuren der FeS Domäne

Beide in der Struktur von *pab* ABCE 1 erkennbaren FeS-Cluster werden von jeweils vier konservierten Cysteinen kovalent gebunden. In *pab* ABCE1 wird der Cluster I durch die Cysteine 15, 20, 25 und 65^{pab} koordiniert, Cluster II wird durch die Cysteine 55^{pab}, 58^{pab}, 61^{pab} und 29^{pab} koordiniert (Abbildung 5.6 und 5.7)



Abbildung 5.6 **Sequenzvergleich von ABCE1 aus *C. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens* und *Pyrococcus abyssi*.**

Die FeS Domänen von ABCE1 aus verschiedenen Organismen sind sehr konserviert. (Konservierte Reste wurden dunkel hervorgehoben. Rotes Sternchen, konservierte hydrophobe Reste, die die beiden Eisen-Schwefel-Cluster umgeben; grünes Sternchen, konserviertes Glycin an der Clusteroberfläche)

Beide FeS-Cluster werden neben der Bindung zu den Cysteinen über Wasserstoffbrückenbindungen zu Hauptkettenamiden stabilisiert. In Tabelle 5.1 sind die Abstände der Schwefel der Cysteine zu den Hauptkettenamiden zusammengefasst.

Tabelle 5.1 *Distanzen (Å) von N-H...S Wasserstoffbrückenbindungen in den Eisen-Schwefel-Clustern (Reste nummeriert nach pab ABCE 1).*

	Donor NH	N-S Distanz (Å)
Cluster I	Leu 24	4,7
	Cys 25	4,00
	Asn 16	3,36
Cluster II	Thr 56	3,41
	Cys 58	3,74
	Cys 61	3,64

Nach Giastas et. al (Giastas et al., 2006) ist das Redoxpotential von Proteinen von mehreren Parametern abhängig, dazu zählen die Zugänglichkeit der Cluster durch das Lösungsmittel und die Anzahl und der Typ der Wasserstoffbrückenbindungen der Cysteine zu den Hauptkettenamiden (N-H...S Bindungen). Je besser ein Cluster vom umgebenden Lösungsmittel erreichbar ist, desto positiver sollte sein Redoxpotential sein. Obwohl Ferredoxine sehr klein sind, sind die beiden FeS-Cluster und ihre Umgebung sehr gut vom Lösungsmittel abgeschirmt (Duee et al., 1994). Vergleicht man die Sequenzen von ABCE1 aus verschiedenen Organismen, so fällt auf, dass eine Reihe von Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten sehr konserviert sind (Abbildung 5.6). Einige dieser hoch konservierten Reste umgeben die beiden Eisen-Schwefel-Cluster und schirmen so die Cluster vor dem umgebenden Lösungsmittel ab. So sind beide Cluster von Prolinen umgeben (Cluster I: P17^{pab} und P66^{pab}, Cluster II: P27^{pab}). Um den Eisen-Schwefel-Cluster II bilden die Aminosäuren V31^{pab}, I39^{pab}, V/I41^{pab}, I50^{pab}, I60^{pab} und V/I6^{pab} einen hydrophoben Kokon (Abbildung 5.7). Gut vom umgebenden Lösungsmittel erreichbar ist Cluster II an der Position G57^{pab}, C58^{pab} und G59^{pab}. Hier ist der Schwefel des Cysteins von Cluster II von außen für einen möglichen Elektronentransfer zugänglich (Abbildungen 5.5 und 5.7).

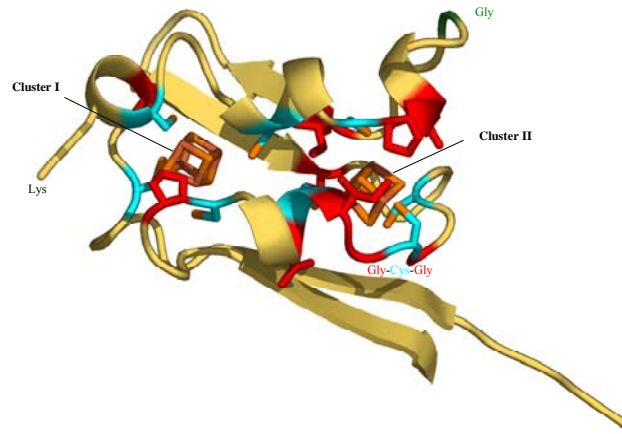


Abbildung 5.7 **Die beiden [4Fe-4S]-Cluster und ihre Umgebung sind sehr gut vom Lösungsmittel abgeschirmt**

Konservierte, aliphatische Reste (rot) umgeben die Eisen-Schwefel-Cluster und bilden einen Schutz vor umgebenden Lösungsmittel. Cluster I ist von zwei Prolinen umgeben, Cluster II von einem Prolin und einigen Valinen bzw. Isoleucinen. (FeS, orange; Cysteine mit Seitenketten, cyan; konserviertes Glycin an der Oberfläche, grün; konserviertes Lysin für den Elektroneneintritt, gelb).

5.2.3 Mutationen in der Eisen-Schwefel-Cluster Domäne

Die Eisen-Schwefel-Cluster der N-terminalen Domäne werden durch die Mitochondrien bereitgestellt und im Cytosol vervollständigt (Lill and Muhlenhoff, 2005). Bis heute gibt es nur eine biologische Funktion, die Mitochondrien in *S. cerevisiae* unter allen Wachstumsfaktoren (aerob und anaerob) essentiell machen, nämlich die Herstellung von FeS-Cluster Proteinen (Lill et al., 2005). Das einzige essentielle FeS-Cluster Protein das bisher bekannt ist, ist ABCE1. Deshalb war zu erwarten, dass Mutationen der koordinierenden Cysteine in der FeS Domäne letal für Hefen sind. Übereinstimmend mit dieser Annahme führte die Mutation C69A^{yeast} (Cluster I) zu einem letalen Phänotyp. Überraschenderweise hatte die Mutation der Aminosäure C29^{yeast} (entspricht C28^{pab}) zu Alanin (Cluster II) keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit. Eukaryotisches ABCE1 enthält im Gegensatz zu *pfu* und *pab* ABCE1 ein zusätzliches freies Cystein zwischen den beiden FeS-Clustern. Auch viele Ferredoxine enthalten an derselben Position ein Cystein. Bei dem archaealen Ferredoxin I aus *Azotobacter vineladii* (*azo*) konnte gezeigt werden, dass das freie Cystein C24^{azo} den Cluster Liganden C20^{azo} ersetzen kann, wenn C20^{azo} mutiert wird (Martin et al., 1990). Bei *pab* ABCE1 ist an der Position des freien

Cysteins ein Alanin (A37^{pab}), das allerdings in der richtigen Position wäre, um als Cystein den FeS-Cluster zu koordinieren (Abbildung 5.8).

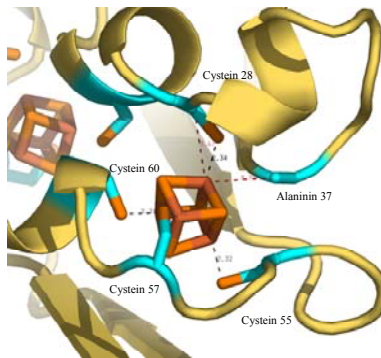


Abbildung 5.8 Die Position von Alanin 37 bei pab ABCE1.
Bei vielen ABCE1 Proteinen ist an der der Position der Aminosäure A37^{pab} ein Cystein, das auch den Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren kann.

5.2.4 Die Eisen-Schwefel-Cluster Domäne hat enge Kontakte zur NBD 1

Die Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) Domäne von ABCE1 steht über die Seitenketten von konservierten Aminosäuren in engem Kontakt mit der Nukleotidbindungsdomäne 1 (NBD 1). Die NBD1 enthält einen Loop, den sogenannten Y-Loop I (Aminosäuren 84-91^{pab}), der fünf hoch konservierte Aminosäuren (Sequenz: HRYXXNXE) enthält. Die Reste H84^{pab} und F91^{pab} des Y-Loops bilden eine aromatische Bindungsstelle für den Adeninring des ADP (bzw. ATP) Moleküls. R85^{pab} und N89^{pab} bilden über ihre geladenen Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen zur Haupt- und Seitenkette der FeS Domäne (Abbildung 5.9) Die Seitenkette von N89^{pab} bildet eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe von Y11^{pab} der FeS Domäne aus. Gleichzeitig bildet N89^{pab} eine Wasserstoffbrückenbindung zum Hauptkettenstickstoff des I49^{pab} aus. Die geladenen Seitenketten von R85^{pab} und E51^{pab} der FeS Domäne bilden eine weitere Wasserstoffbrücke.

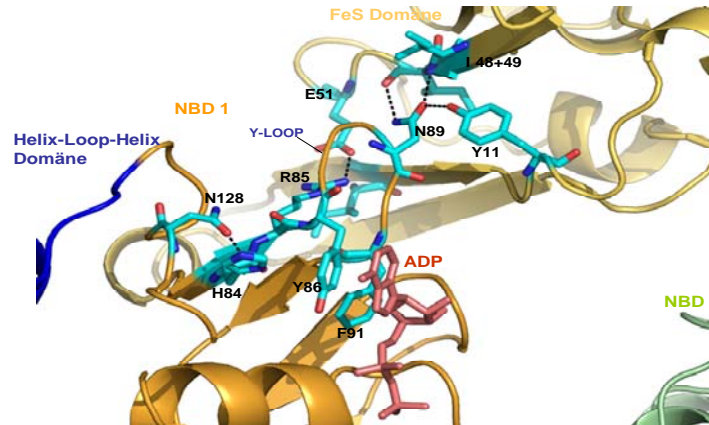


Abbildung 5.9 **Der Y-Loop, die FeS Domäne und die HLH Domäne sind über Wasserstoffbrücken eng verbunden**

Modell der Proteinstruktur des N-Terminus von *pab ABCE1*. $R85^{pab}$ und $N89^{pab}$ bilden über ihre geladenen Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen zur Haupt- und Seitenkette der FeS Domäne. Das konservierte $H84^{pab}$ des Y-Loops I steht über eine Seitenkettenwasserstoffbrückenbindung im engen Kontakt mit dem konservierten $N128^{pab}$ der HLH Domäne. $H84^{pab}$ und $F91^{pab}$ des Y-Loops binden den Adeninring des ATP/ADP Liganden. (FeS, gelb, NBD 1, orange NBD 2, grün, Helix-Loop-Helix, blau, ADP, rot, Reste, die Wasserstoffbrücken zwischen den Domänen bilden sind nach Element gekennzeichnet)

Die Seitenketten des $H84^{pab}$ bilden Wasserstoffbrücken mit dem konservierten $N128^{pab}$, das den N-Terminus der Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne bildet. Der Y-Loop I könnte so eine wichtige Verbindung zwischen dem aktiven Zentrum mit der ATP Bindungsstelle, der essentiellen FeS Domäne und der HLH-Domäne herstellen. Bei einer durch die Bindung von ATP ausgelösten möglichen Konformationsänderung, könnte der Y-Loop I als Signalübermittler direkt auf die benachbarten Domänen einwirken.

Bei dem Konstrukt *pfu ABCE1 N2*, das als erstes kristallisiert wurde, befand sich nur ein ADP in der NBD 2, während das aktive Zentrum der NBD 1 leer war. Der N-Terminus dieses Konstruktes lag im Y-Loop der NBD1, nach der konservierten Aminosäuresequenz HRY, und inserierte in das β -Faltblatt eines zweiten Moleküls in der asymmetrischen Einheit unter Bildung eines Dimers (Abbildung 4.16). Da der Y-Loop I mit dem konservierten Tyrosin wichtig für die Bindung des Adeninrings des ADP ist, konnte diese verkürzte Mutante kein Nukleotid mehr binden. Das daraufhin um 11 Aminosäuren verlängerte Konstrukt *pfu ABCE1 Δ FeS* mit dem korrekt gefalteten Y-Loop I, kristallisierte nicht nur schneller und als Monomer, sondern hatte auch in beiden

NBD jeweils ein ADP gebunden. Der Y-Loop II der NBD 2 ist nicht so hoch konserviert wie der Y-Loop I der NBD 1. Er enthält aber ebenfalls ein konserviertes Tyrosin (Y349^{pab}) und ein Phenylalanin (F 352^{pab}), die zusammen die aromatische Bindungsstelle für den Adeninring des ATPs bilden.

5.3 Die Scharnierregion und die Helix-Loop-Helix Domäne

ABCE1 enthält neben der Eisen-Schwefel-Domäne an zwei weiteren Positionen für ABC Proteine neuartige Domänen: Die Scharnierregion, die sich aus Hinge I und Hinge II zusammensetzt und die Helix-Loop-Helix Region der NBD 1 (Abbildung 5.10). Beide Domänen sind bei allen ABCE1 Proteinen konserviert.

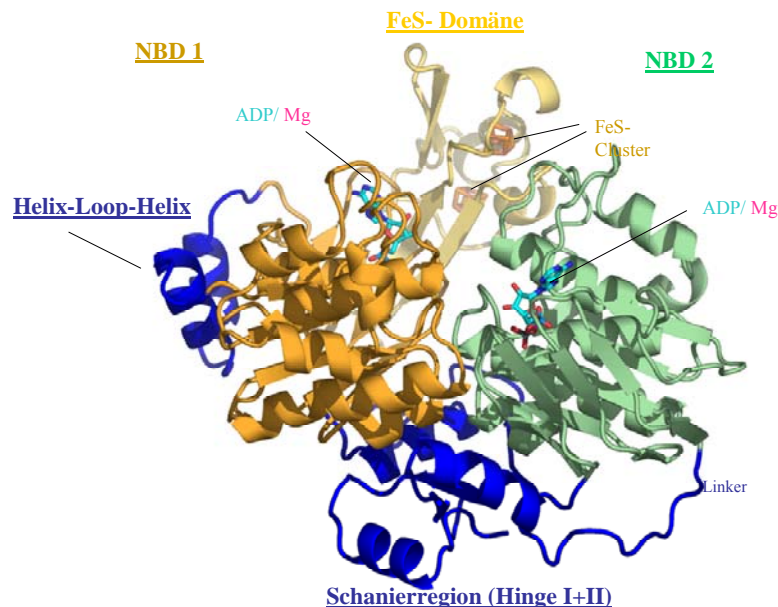


Abbildung 5.10 ABCE1 ist aus fünf Domänen aufgebaut
 ABCE1 hat zwei NBD, die durch eine für ABC Enzyme neuartige Scharnierregion verbunden sind. Die Helix-Loop-Helix Domäne liegt seitlich der NBD 1.

Hinge I der Scharnierregion bildet den C-Terminus der NBD 1 und führt über einen Linker zur NBD 2. Hinge II wird aus dem C-Terminus von ABCE1 gebildet. Hinge I und Hinge II sind untereinander durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken fest verbunden. Diese Wasserstoffbrücken werden durch mehrere Arginine (Arginincluster: R300^{pab}, R559^{pab}, R560^{pab}, R566^{pab}, R568^{pab}) gebildet. Vergleicht man alle ABCE1 Sequenzen (siehe Anhang), so sind diese Arginine zwischen allen Organismen sehr konserviert. Bei

allen bisher bekannten ABC ATPasen haben die Nukleotidbindungsdomänen (NBD) ohne ATP Bindung keine starke Interaktion miteinander. Bei ABCE1 ist die Scharnierregion strukturell eng mit der NBD 1:NBD 2-Berührungsfläche verbunden. Durch diese Region werden möglicherweise mechanochemische, ATP abhängige Signale übertragen. Die beiden Berührungsflächen der NBD von ABCE1 haben eine Fläche von ca. 1300 \AA^2 , die denen in anderen ABC ATPasen entspricht. Im Gegensatz dazu hat die Scharnierregion eine Kontaktfläche von 3500 \AA^2 mit den NBD. Durch den engen, verhältnismäßig großen und hydrophoben Kontakt der Scharnierregion mit den NBD ist die Lage der NBD zueinander festgelegt, und sie werden auch in Abwesenheit von ATP zusammengehalten. Die ATP-Bindung bewirkt strukturelle Veränderungen innerhalb der Scharnierregion (siehe Abbildung 5.13). Eine mögliche Veränderung könnte in der Berührungsfläche zwischen Hinge I und Hinge II geschehen. Diese Region enthält den konservierten Arginincluster und formt damit eine hochkonservierte Oberflächenteil (siehe Abbildung 4.16). Falls dieser Cluster an der ATP getriebenen Konformationsänderung beteiligt ist, sollten Mutationen in diesem Bereich letal sein. Deshalb wurden in Kollaboration mit Birgit Märtens Mutanten von ABCE1 in *S. cerevisiae* generiert und *in vivo* untersucht. Wie erwartet sind die Mutanten R311E^{yeast} und R573E^{yeast} letal. Vermutlich hat der Arginincluster eine wichtige Funktion für ABCE1, er könnte z.B. die ATP- abhängige Konformationsänderungen der NBD auf ein mögliches Substrat vermitteln. Diese Vermutung wird von der Beobachtung gestützt, dass die Mutante S588E^{yeast} letal ist. Hier könnte durch die Mutation an der Oberfläche der Scharnierregion eine mögliche Substratkontaktstelle betroffen sein. Eine andere mögliche Erklärung für den essentiellen Charakter des Argininclusters ist, dass die Scharnierregion die Position der NBD zueinander festlegt und die Mutationen damit die ATP-Bindung und/ oder die Hydrolyse beeinflussen. Vergleicht man die Position der Scharnierregion mit anderen Strukturen von ABC ATPasen, so fällt auf, dass diese Region bei ABCE1 einzigartig ist. An der entsprechenden Stelle liegen aber Interaktionsseiten (Abbildung 5.11). Das NBD Dimer von MalK interagiert über diese Region mit regulatorischen Untereinheiten, das SMC Dimer mit den regulatorischen Kleisin Untereinheiten und bei MutS ist die C-terminale Region für die Tetramerisierung verantwortlich (Chen et al., 2003; Haering et al., 2004; Lamers et al., 2000).

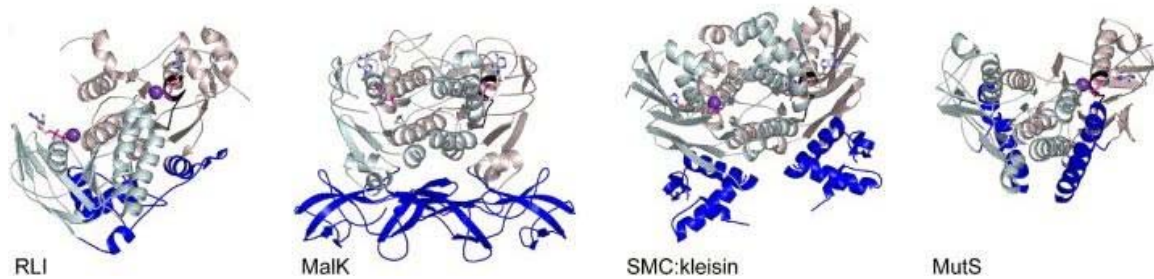


Abbildung 5.11 **Interaktionsseiten an der Scharnierregion von ABC ATPasen** (Lebbink and Sixma, 2005)

Die Scharnierregion von ABCE1 ist bei anderen ABC ATPasen nicht vorhanden, an der Position liegen aber Interaktionsseiten. Das NBD Dimer von MalK interagiert über diese Region mit regulatorischen Subunits, das SMC Dimer mit den regulatorischen Kleisin Subunits und bei MutS ist die C-Terminale Region für die Tetramerisierung verantwortlich (Chen et al., 2003; Haering et al., 2004; Lamers et al., 2000).

Die Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne sitzt seitlich der NBD 1 (Abbildung 5.10). Eine der HLH Domäne ähnliche, wenn auch kürzere, helikale Insertion des ABC Transporters BtuCD bildet eine Kontaktfläche zu assoziierten Transmembrandomänen (Locher et al., 2002). In MutS verbindet diese Domäne die NBD mit DNA bindenden Domänen (Lamers et al., 2000; Locher et al., 2002). Die HLH Domäne steht über den Y-Loop im engen Kontakt mit dem aktiven Zentrum der NBD 1. Eine durch die Bindung von ATP im aktiven Zentrum ausgelöste Konformationsänderung, könnte damit auch die HLH beeinflussen.

5.4 Die strukturell diverse Region

Vorangegangene Ergebnisse aus anderen ABC ATPasen haben gezeigt, dass die NBD der ABC ATPasen oft über die strukturell diverse Region (SDR) mit weiteren Domänen kommunizieren. Bei der SMC Familie der ABC ATPasen und bei Rad50 befindet sich dort die 600 bis 900 Aminosäuren der coiled-coiled Domäne (CCD) (Hopfner et al., 2000), an die bei Rad50 die Nuklease Mre11 bindet. Bei ABC Transportern (z.B. BtuCD) bindet an die SDR eine Transmembrandomäne (TMD) (Locher et al., 2002) (Abbildung 5.12). Nach der ATP-Bindung entsteht aus zwei Rad50 Monomeren bzw. aus zwei ABC-Transporter Monomeren ein antiparalleles Homodimer, dadurch werden Konformationsänderungen der NBD über die SDR auf die benachbarten Regionen

übertragen. Dies geschieht z.B. bei Rad50 über die CCD auf daran gebundenes Mre11 (Haering et al., 2004; Hopfner et al., 2000; Locher et al., 2002).

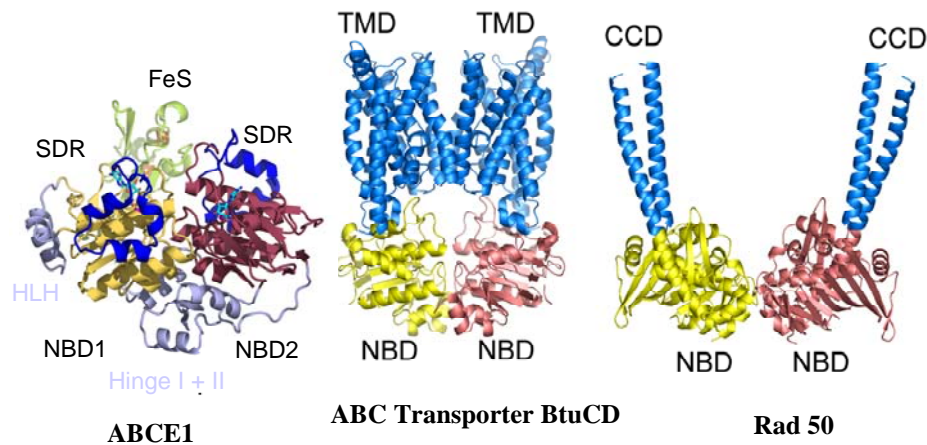


Abbildung 5.12 Vergleich des Aufbaus *pab* ABCE1 mit dem Aufbau von ABC Transportern und DNA Reparatur Enzymen
 Die NBD der ABC Enzyme kommunizieren oft über die strukturell diverse Region mit weiteren Domänen. Bei der SMC Familie und bei Rad50 (rechts, PD BID 1F2U (Hopfner et al., 2000)) der ABC ATPasen sind das N-terminale Walker-A und das C-terminale Walker-B Motiv durch die 600 bis 900 Aminosäuren der coiled-coiled Domäne getrennt, bei ABC Transportern (z.B. BtuC, mitte, PDB ID 1L7V (Locher et al., 2002)) bindet eine Transmembrandomäne. (Strukturell diverse Region, blau, NBD 1, gelb; NBD 2, rot; Hinge I, II und Helix-Loop-Helix Domäne, grau; FeS Domäne, grün).

Der Aufbau von ABCE1 ist neuartig für strukturell charakterisierte ABC ATPasen. Bei ABCE1 ist die SDR nicht sehr konserviert, viele Mutationen in *S. cerevisiae* in diesem Bereich zeigen keinen Phänotyp I422V, T429E, R431A, K453Q, D462A, E464A). Auffällig ist aber eine bei vielen Organismen konservierte Sequenz (Aminosäuren K453^{yeast}, P454^{yeast}, L455^{yeast}) in der SDR der NBD 2. Die Mutation des Lysins an der Oberfläche der SDR (K453A^{yeast}) ist letal (Ergebnisse von Birgit Märten, Genzentrum, München). Die konservative Mutante K453Q zeigte keinen Phänotyp. Die SDR könnte jedoch trotz ihrer geringen Konservierung für die Funktion von ABCE1 von großer Bedeutung sein, z.B. durch die Interaktion mit einem Elektronendonator. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass bei *pab* ABCE1 ein Kontakt zwischen

der FeS-Cluster Domäne und der SDR besteht. Dieser Kontakt wird durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Resten N68^{pab} der FeS Domäne und D449^{pab} der SDR hergestellt.

5.5 Das aktive Zentrum

Aus allen bisher untersuchten ABC ATPasen ist durch genetische, biochemische und strukturelle Arbeiten ist bekannt, dass funktionelle ABC Proteine Dimere bilden (Hopfner et al., 2000; Walker et al., 1982). Erst dadurch können sie ATP binden und hydrolysieren und somit ihre biologische Funktion erfüllen. Dabei kontrolliert ATP die Dimerisierung, und umgekehrt löst die ATP-Hydrolyse die Verbindung zwischen den NBD. Durch diesen Prozess werden auch die Bindung und Ausrichtung weiterer an der Quartärstruktur beteiligten Proteine kontrolliert (Hopfner and Tainer, 2003). Obwohl viele Strukturen von NBD von ABC Proteinen im Komplex mit verschiedenen Nukleotiden (ATP, ADP, und im Übergangszustand) bekannt sind, wird der Mechanismus der ATP-Bindung, die damit verbundene Konformationsänderung und die ADP-Freisetzung noch nicht genau verstanden (Abbildung 5.13).

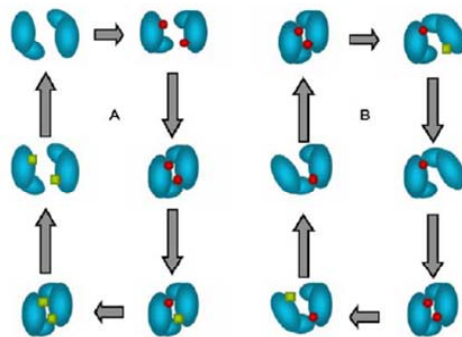


Abbildung 5.13 Für die ATP Hydrolyse von ABC Proteinen gibt es zwei mögliche Mechanismen.
 A) „Processive clamp mechanism“, bei dem beide ATP hydrolysiert werden, daraufhin öffnet sich das Dimer und ADP wird gegen ATP ausgetauscht
 B) „Alternating cycle model“, es wird nur ein ATP hydrolysiert.
 (Abbildung aus (Oswald et al., 2006).

ATP-Hydrolyse in zwei aktiven Zentren könnte durch eine abgestimmte, gemeinsame und symmetrische Reaktion in beiden aktiven Zentren („processive clamp mechanism“)

vollzogen werden. Nach der Hydrolyse beider ATPs dissoziiert das NBD Dimer, und die entstandenen ADP Moleküle werden mit ATP ausgetauscht (Janas et al., 2003; van der Does and Tampe, 2004). Bei einem zweiten diskutierten Mechanismus der ATP Hydrolyse, dem „alternating cycle model“ (Senior et al., 1995) oder „two-cylinder engine“ Mechanismus, wird ein ATP in einem aktiven Zentrum hydrolysiert. Anschließend öffnet sich das aktive Zentrum, um ADP gegen ATP auszutauschen. Bis dahin bleibt das zweite aktive Zentrum geschlossen, es kann erst ATP hydrolysieren, wenn auch das erste aktive Zentrum wieder in der geschlossenen Konformation vorliegt (Oswald et al., 2006).

Die Struktur von ABCE1 ist die erste Struktur eines ABC Proteins, in dem die aktiven Zentren nicht aus einem Homodimer, sondern aus zwei unterschiedlichen Domänen eines Proteins gebildet werden. Dabei entsteht ein NBD „Heterodimer“. Bei den von uns gelösten Strukturen, die aus drei verschiedenen Organismen stammen, befand sich in beiden aktiven Zentren ADP. Ergebnisse der ortsspezifischen Mutationen in den aktiven Zentren zeigten, dass die ATP-Hydrolyse in beiden NBD wichtig für den zellulären Mechanismus von ABCE1 ist. *S. cerevisiae* ist nicht mehr lebensfähig, wenn man wichtige Aminosäuren in jeweils einem aktiven Zentrum verändert. Wie aus Untersuchungen an SMC Proteinen bekannt ist, beeinträchtigen Mutationen des konservierten Glutamats im Walker-B Motiv die Dimerisierung nicht. Eine ATP Hydrolyse ist in diesen Mutanten aber nicht möglich, da die γ -Phosphatbindung des ATP nicht nukleophil angegriffen werden kann (Lammens et al., 2004). Mutiert man in *S. cerevisiae* bei ABCE1 das Glutamat einer NBD (E247Q^{yeast} der NBD 1, E493Q^{yeast} der NBD 2), so sind die Zellen letal. Mutationen im Walker-A Motiv der NBD 1 (K116A^{yeast}, K116W^{yeast}) waren ebenso wenig lebensfähig wie Mutationen im Walker-A Motiv der NBD 2 (K391A^{yeast}). Bei diesen Mutanten konnte die negative Ladung des Phosphats im Nukleotid durch Alanin oder Tryptophan nicht kompensiert werden. Die Nukleotidbindung in dem aktiven Zentrum war gestört.

Eine sehr bekannte Mutation im aktiven Zentrum, die Mutationen des konservierten Serins im Signatur-Motiv bei der ABC ATPase „cystic fibrosis conductance regulator“ (CFTR, S549R^{CFTR}), führt bei betroffenen Patienten zu Mukoviszidose. Mutiert man die analoge Aminosäure aus ABCE1 in jeweils einer NBD (S223R^{yeast} der NBD 1, bzw.

S469R^{yeast} des NBD 2), so zeigte *S. cerevisiae* einen letalen Phänotyp. Von Rad50 ist bekannt, dass Mutationen an der analogen Sequenz im Signatur-Motiv eine ATP Bindung und damit die Dimerisierung der homodimeren ABC ATPase verhindern (Moncalian et al., 2004).

Eine Überlagerung von NBD 1 mit NBD 2 zeigt weiterhin, dass beide aktive Zentren in der ADP gebundenen Form strukturell annähernd identisch sind (Abbildung 5.14).

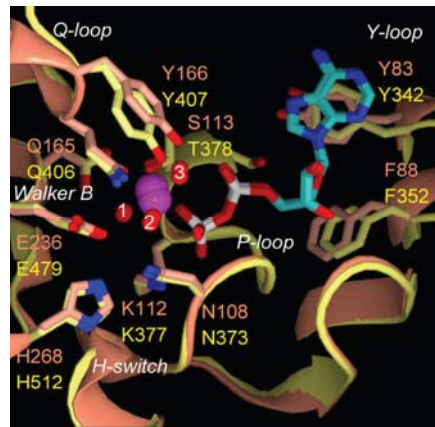


Abbildung 5.14 Überlagerung der Hauptketten der beiden NBD von pfu ABCE1
Das Strukturmodell beider NBD von ABCE1 sind für einen Vergleich aufeinander abgebildet worden. Beide aktive Zentren sind strukturell gleich. Reste, die für die Nukleotidbindung und Hydrolyse wichtig sind, werden in einer „ball-and-stick“ Präsentation dargestellt (NBD1, braun, NBD2, gelb, ADP, cyan, Sauerstoff, rot, Stickstoff, blau, Phosphor, weiß Magnesium, lila).

Die Standardabweichung der C_{α} von NBD 1 und NBD 2 beträgt 1,09 Å (Tabelle 5.2). Diese strukturelle Gleichheit von beiden NBD lässt den Schluss zu, dass sich beide NBD im gleichen funktionellen Stadium befinden. Die Ergebnisse aus unseren strukturellen und den ortsspezifischen Mutagenesen unterstützen das Modell des „Processive clamp mechanism“, da in diesem Modell beide ATP hydrolysiert werden, bevor sich das Dimer löst und ADP durch ATP ersetzt wird.

Da bei den strukturellen Untersuchungen nur ein isoliertes ABCE1 Protein ohne mögliche Kofaktoren untersucht wurde, ist es möglich, dass in vivo das „alternating cycle model“ zutrifft. Da Mutationen in einem aktiven Zentrum schon letal sind, ist unter Umständen die abwechselnde Aktivität essentiell.

Tabelle 5.2 Vergleich der NBD Domänen von ABCE1 mit den NBD Domänen von anderen ABC ATPasen

	ABCE1		ABCE1 NBD1 ^a		ABCE1 NBD2 ^b	
	Standard-abweichung(Å)	No. of C _α	Standard-abweichung (Å)	No. of C _α	Standard-abweichung(Å)	No. of C _α
ABCE1 NBD1 ^a	—	—	—	—	1,09	186
ABCE1 NBD2 ^b	—	—	1,09	186	—	—
CTV-BtuD	1,99	322	1,28	170	1,23	169
ATP-MJ0796	—	—	1,35	161	1,38	163
ATP-MalK	—	—	1,44	168	1,32	169
apo-MalK	—	—	1,96	148	1,80	150
ATP-SMC1	—	—	1,76	143	1.74	144

^a Reste von ABCE1 NBD1: 75-329, ^b Reste von ABCE1 NBD2: 330-590

Abkürzungen: CTV-BtuCD: Die cyclotetranavat gebundenen Form der NBD des Vitamin B12 Transporter (1L7V). ATP-MJ0796: Die ATP gebundene Form der NBD des archaealen Transporter MJ0796 (1L2T). ATP-MalK: ATP gebundene Form des NBD des Maltosetransporters (1Q12). ATP-SMC: ATP gebundene Form der NBD von dem Protein structural maintenance of chromosomes (SMC1) (1W1W). In der Tabelle werden außerdem die Nummern der für die Überlagerung verwendeten C_α angegeben

Mit einer DALI Suche in der Protein Daten Bank, einer anschließenden Proteinüberlagerung mit LSQMAN, Berechnungen der Standardabweichungen und manueller Beurteilung wurden die NBD von ABCE1 mit den NBD anderer ABC ATPasen verglichen. Der Vergleich in Tabelle 5.2 zeigt, dass ABCE1 die stärkste Ähnlichkeit zu der Tetradeccavanadat-gebundenen NBD des ABC Transporters BtuCD (Locher et al., 2002) besitzt. Die Standardabweichung in einer strukturellen Überlagerung von ABCE1 mit dem ABC Transporter BtuCD beträgt 1,99 Å über 322 C_α-Atome (~ komplette NBD), bzw. 1,28 Å (1,23) über 170 (169) C_α-Atome (NBD 1 bzw. NBD 2). Die Lage der konservierten Motive der NBD in ABCE1 entspricht der Lage der Motive der NBD in anderen Mitgliedern der ABC Protein Familie (Chen et al., 2006; Hopfner et

al., 2000; Locher et al., 2002). Vergleicht man nicht nur die einzelnen NBD Domänen sondern das ATP gebundene Homodimer von BtuCD mit dem theoretischen Modell eines ATP gebundenen NBD1:NBD2 Heterodimers von ABCE1 lässt sich eine hohe strukturelle Übereinstimmung feststellen (siehe Abbildung 5.15, A).

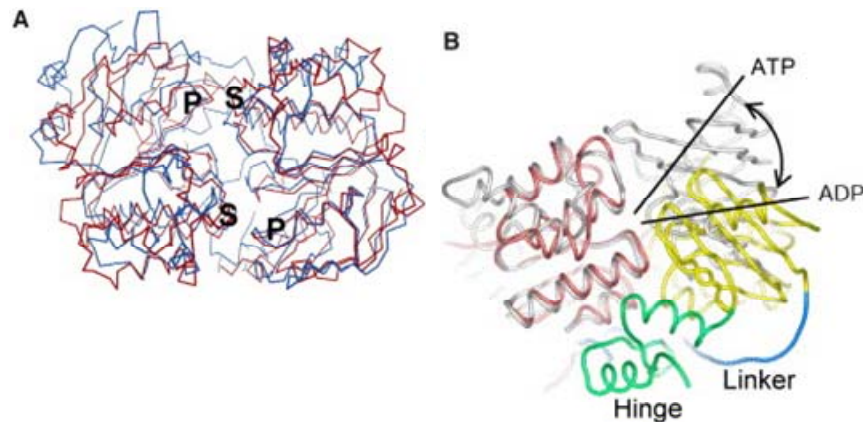


Abbildung 5.15 Überlagerung des Strukturmodells der NBD von pfu ABCE1 Δ FeS mit den homodimeren NBD des ABC Transporters BtuCD

A) Überlagerung der NBDs von pfu ABCE1 Δ FeS (rot) mit den beiden NBD des ABC Transporters BtuCD (blau) (P = P-Loop, S = Signatur-Motiv)

B) Überlagerung der Hauptketten der NBD in der ATP gebundenen Form von MJ0796 mit den beiden NBD von pfu ABCE1 Δ FeS. Die NBD 1 von pfu ABCE1 Δ FeS wurde dabei direkt auf eine MJ0796 Untereinheit gelegt, NBD 2 muss um $\sim 40^\circ$ gedreht werden (rot, NBD 1; gelb NBD 2; grün, Hinge II; blau, Hinge I).

Um darüber hinaus die strukturellen Veränderungen durch die Bindung von ATP zu untersuchen, wurde pfu ABCE1 Δ FeS mit dem ATP-gebundenen Dimer des bakteriellen ABC Transporters MJ0796 verglichen (Abbildung 5.15, B). Dazu wurde die NBD 1 von pfu ABCE1 Δ FeS direkt mit einer MJ0796 Untereinheit überlagert. Um die NBD 2 von pfu ABCE1 Δ FeS mit der 2. Untereinheit von MJ0796 zu überlagern, muss diese um $\sim 40^\circ$ gedreht werden (Abbildung 5.15 B).

Bei ABCE1 führen ATP Bindung zur Bildung eines heterodimeren NBD Sandwich aus NBD 1 und NBD 2 eines Moleküls. Die beiden NBD klappen zusammen und bilden ein NBD 1 - 2ATP - NBD 2 Sandwich.

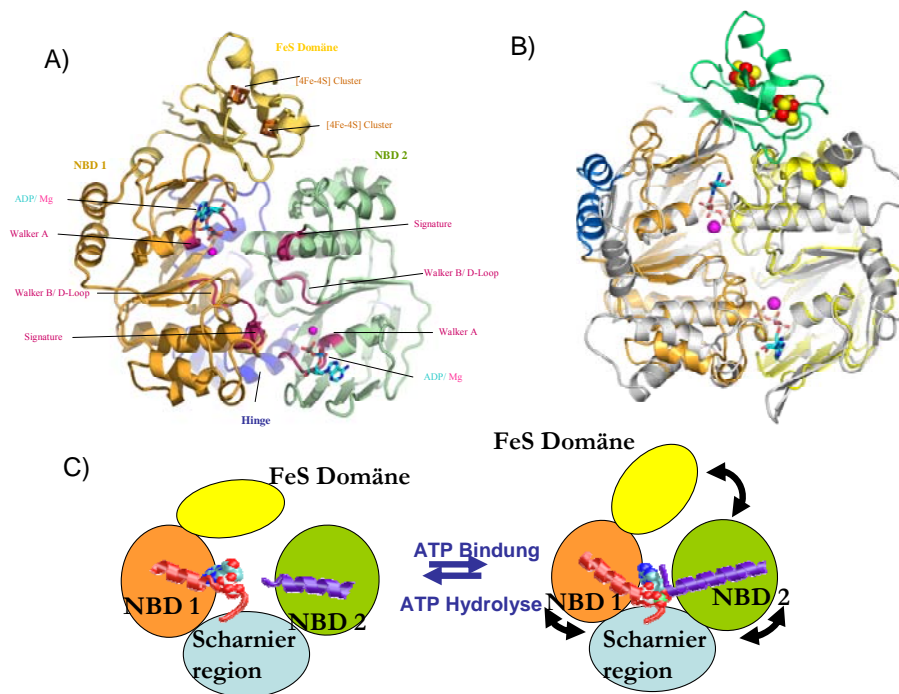


Abbildung 5.16 **Vergleich zwischen der ADP (A) und ATP (B) gebundenen Konformation von pab ABCE1.**

A) Strukturmodell von pab ABCE1 in der ADP gebundenen Konformation (braun, NBD 1, grün, NBD 2, gelb, FeS Domäne, blau, Scharnierregion)

B) Theoretisches Strukturmodell von pab ABCE1 in der ATP gebundenen Konformation. Um die Konformationsänderung sichtbar zu machen wurden die NBD von ABCE1 in ADP-gebundenen Form mit den NBD von MJ0796 in ATP gebundener Konformation überlagert (braun, NBD 1, gelb, NBD2, grau MJ0796, grün, FeS Domäne, blau, HLH Domäne).

C) Um die Konformationsänderung nach ATP-Bindung zu ermöglichen muss die FeS Domäne sterisch von der NBD 2 weggeschoben werden. Die Scharnierregion muss flexibel nachgeben (orange, NBD 1; grün, NBD2; gelb, FeS Domäne; blau, Scharnierregion).

In der ADP gebundenen Form lassen sich zwei Regionen mit hoher Flexibilität identifizieren: Der Q-Loop und das Signatur-Motiv, die beide potentielle Interaktionsstellen mit dem γ -Phosphat des ATP bilden. Durch ATP Bindung werden diese beiden Regionen wahrscheinlich stabilisiert und könnten auch Positionsänderungen vollziehen (Oswald et al., 2006). Nachdem in der ADP gebundenen Form das Signatur-Motiv ca. 11 Å von der erwarteten Lage des ATP γ -Phosphats entfernt liegt, müssen sowohl die FeS Domäne, als auch die Scharnierregion (Hinge I und Hinge II) große Veränderungen erfahren. Dies erfordert, dass die Scharnierregion flexibel nachgeben

muss um die Konformationsänderung zu ermöglichen (Abbildungen 5.15 und 5.16 B). Die FeS Domäne ist in der ADP gebunden Form über Wasserstoffbrücken mit der strukturell diversen Region der NBD 2 verbunden. Durch die Konformationsänderung nach der Bindung von ATP erfordert dies aber ein sterisches wegschieben von der NBD 2, damit sie nicht in die NBD 2 geschoben wird (Abbildung 5.16 B, C). Die strukturelle Veränderung könnte eine ATP-abhängige Signalübermittlung auf ein Substrat vermitteln.

5.6 Biologische Funktion von ABCE1

ABCE1 ist an einer Vielzahl von sehr unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt, wie RNase L Inhibition (Bisbal et al., 1995), Beteiligung an der Bildung des unreifen HIV-1-Kapsids (Zimmerman et al., 2002) sowie an der Ribosomenbiogenese und der Translationsinitiation (Dong et al., 2004; Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Bei allen diesen Prozessen hat RNA eine wichtige Bedeutung. ABCE1 ist ein konserviertes Protein, das sowohl in Eukaryoten als auch in Archaeen vorkommt. Zentrale molekulare Prozesse der Archaeen, zum Beispiel Translation und Transkription, sind denjenigen der Eukaryoten recht ähnlich (Aravind and Koonin, 2000). Da sowohl die Proteinstruktur von ABCE1 und dessen Rolle in der Translationsinitiation (bei allen untersuchten Eukaryoten) konserviert ist (Andersen and Leervers, 2007), könnte in der Translationsinitiation die fundamentale Aufgabe von ABCE1 liegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass ABCE1 eine weitere Funktion in allen bisher bekannten Prozessen besitzen könnte. Die ferredoxinähnliche Struktur der N-terminalen FeS Domäne von ABCE1 macht eine Beteiligung an elektronentransportierende Redoxprozessen möglich. Berücksichtigt man die Ergebnisse dieser Arbeit, könnte z.B. die Aufgabe von ABCE1 in der Erkennung und Modifikation (chemisch oder konformativ) von RNA durch die beiden [4Fe-4S] Cluster sein. Eine Möglichkeit wäre, dass ATP-Bindung und –Hydrolyse durch ABCE1 eine, bisher nicht bekannte, oxidierenden oder reduzierenden Modifikation z.B. von RNA oder anderen Kofaktoren kontrollieren. Umgekehrt könnten auch die FeS-Cluster die Aktivität der Nukleotidbindungsdomänen beeinflussen, z.B. durch eine Reaktion auf die Veränderungen von Umweltbedingungen wie eine Erhöhung von oxidativen Substanzen.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur von zu ABCE1 bestimmt. ABCE1 ist ein Mitglied der „ATP Binding Cassette“ (ABC) Superfamilie. Durch drei zusätzliche Domänen unterscheidet sich ABCE1 aber von allen bislang bekannten Mitgliedern dieser Familie. Während dieser Doktorarbeit konnte ich zunächst nur ein Teil der Struktur mit Röntgenkristallografie bestimmen, nämlich die der beiden ABC ATPase Domänen mit der Scharnierregion und der Helix-Loop-Helix Domäne. Die N-terminale cysteinreiche Domäne war bei diesen Konstrukten deletiert. Um das komplette Protein zu kristallisieren, war es im weiteren Verlauf der Arbeit notwendig, ein System zur Rekonstitution der N-terminalen Domäne zu etablieren. Mit Hilfe einer biochemischen Rekonstitution ist es gelungen die Struktur des kompletten ABCE1 zu lösen. Die N-terminale Domäne von ABCE1 bindet zwei Eisen-Schwefel (FeS)-Cluster. Diese Domäne hat hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Ferredoxinen und mit dem ferredoxinähnlichen Strukturmotiv der Oxireduktase Adenylsulfat Reduktase. Eine Gemeinsamkeit von allen elektronenleitenden Ferredoxinen ist der relative Abstand der beiden FeS-Cluster. Um Aussagen über die Funktion der FeS Domäne von ABCE1 zu ermöglichen, wurde die FeS Domäne von *pab* ABCE1 mit FeS Domänen von anderen Proteinen verglichen. Da ABCE1 sowohl eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit ferredoxinähnlichen Proteinstrukturen, als auch die charakteristische Distanz der FeS-Cluster zueinander aufzeigt, hat es mit hoher Wahrscheinlichkeit eine elektronenleitende Funktion.

Neben der FeS Domäne enthält ABCE1 noch an zwei weiteren Positionen für ABC Proteine neuartige Domänen. Eine Scharnierregion verbindet die beiden NBD und setzt sich aus Hinge I und Hinge II zusammen. Eine Helix-Loop-Helix Region befindet sich in der Struktur seitlich der NBD 1. Beide Regionen sind bei allen ABCE1 Proteinen sehr konserviert. Durch die Scharnierregion werden möglicherweise mechanochemische, ATP-abhängige Signale übertragen. Die HLH Domäne hat über einen konservierten Loop (Y-Loop) Kontakt mit dem aktiven Zentrum der NBD 1. ATP Bindung im aktiven Zentrum könnte dadurch auch die HLH Domäne beeinflussen.

ABC Proteine binden und hydrolysieren ATP und können dadurch mechanochemische Arbeit leisten. Die in dieser Arbeit gelöste Struktur von ABCE1 ist

die erste Struktur eines ABC Proteins mit zwei unterschiedlichen NBD. Die funktionale Architektur von ABCE1 ist deshalb neuartig für strukturell charakterisierte ABC Proteine.

ABCE1 hat eine fundamentale Rolle in der HIV-Kapsid Reifung, RNase-L Inhibition, Translationsinitiation und Ribosomenbiogenese. Wie vermutlich alle Mitglieder der ABC Proteinfamilie ist es eine molekulare Maschine, mit einem für diese Familie konservierten Mechanismus der ATP-abhängigen Konformationsänderung. Bei bisher bekannten ABC Proteinen treiben diese mechanochemischen Motoren eine Vielzahl von sehr unterschiedlichen biologischen Prozessen an, wie Membrantransport, DNA Reparatur und Chromosomenzusammenhalt. Die in dieser Arbeit gelöste Struktur von ABCE1 lässt vermuten, dass dieses Mitglied der ABC Proteinfamilie noch mindestens eine weitere Funktion, den Transport von Elektronen, haben könnte. Die genaue biologische Funktion des essentiellen Proteins ABCE1 ist aber weiterhin unklar und muss noch ermittelt werden.

7. Anhang

Abkürzungen

Å	Ångström (= 10^{-10} m)
aa	“Amino acid”
ABC	“ATP binding cassette”
<i>afu</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP- γ -S	Adenosin 5'-O-(thio-triphosphat)
AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphate
BSA	Bovines Serum Albumin
Bp	Basenpaare
Δ FeS	ohne Eisen-Schwefel-Cluster Domäne
Dali	“Distance matrix alignment”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	<u>Dithiothreitol</u> ,
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FeS	Eisen-Schwefel
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
h	„Hours“
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ISC	Iron-Sulfur-Cluster
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	milli
MAD	“Multiple-wavelength anomalous dispersion”
Mg ²⁺	Magnesium Ion
MR	“Molecular replacement”
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
NBD	Nucleotid Bindungsdomäne
NMR	“Nuclear magnetic resonance spectroscopy”
ÜN	Über Nacht
<i>pab</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PCR	“Polymerase chain reaction”
PDB	Protein Daten Bank
PEG	Polyethylen Glykol
<i>pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SAD	“Single wavelength anomalous diffraction”
SDR	Strukturell diverse Region
SDS	“Sodium dodecyl sulfate“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>sso</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
Tris	Trisma Base (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)
V	Volumen
W	“Weight”

CLUSTAL W (1.83) “Multiple Sequence Alignments”

Sequence type explicitly set to Protein

Sequence format is Pearson

Sequence 1: <i>Pyrococcus furiosus</i>	590 aa
Sequence 2: <i>Sulfolobus solfataricus</i>	600 aa
Sequence 3: <i>Pyrococcus abyss</i>	593 aa
Sequence 4: <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	600 aa
Sequence 5: <i>Haloarcula marismortui</i>	609 aa
Sequence 6: <i>Methanosarcina acetivorans</i>	588 aa
Sequence 7: <i>Nanoarchaeum equitans</i>	574 aa
Sequence 8: <i>Thermoplasma volcanium</i>	592 aa
Sequence 9: <i>Homo sapiens</i>	599 aa
Sequence 10: <i>Pan troglodyte</i>	599 aa
Sequence 11: <i>Canis familiaris</i>	599 aa
Sequence 12: <i>Mus musculus</i>	599 aa
Sequence 13: <i>Rattus norvegicus</i>	599 aa
Sequence 14: <i>Gallus gallus</i>	599 aa
Sequence 15: <i>Drosophila melanogaster</i>	611 aa
Sequence 16: <i>Anopheles gambiae</i> str.	608 aa
Sequence 17: <i>Caenorhabditis elegans</i>	610 aa
Sequence 18: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	593 aa
Sequence 19: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	608 aa
Sequence 20: <i>Kluyveromyces lactis</i>	607 aa
Sequence 21: <i>Eremothecium gossypi</i>	607 aa
Sequence 22: <i>Neurospora crassa</i>	607 aa
Sequence 23: ATRLI2, <i>Arabidopsis thaliana</i>	605 aa
Sequence 24: <i>Oryza sativa japonica</i> cultiva	608 aa
Sequence 25: <i>Plasmodium falciparum</i>	619 aa
Sequence 26: <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	624 aa

Paarweiser Sequenzvergleich

Sequenz (1:2): 45.7627	Sequenz (2:2): 100	Sequenz (3:2): 45.0253	Sequenz (4:2): 47.1667	Sequenz (5:2): 36.8333
Sequenz (1:3): 91.3559	Sequenz (2:3): 45.0253	Sequenz (3:3): 100	Sequenz (4:3): 56.4924	Sequenz (5:3): 46.8803
Sequenz (1:4): 57.2881	Sequenz (2:4): 47.1667	Sequenz (3:4): 56.4924	Sequenz (4:4): 100	Sequenz (5:4): 43.8333
Sequenz (1:5): 48.3051	Sequenz (2:5): 36.8333	Sequenz (3:5): 46.8803	Sequenz (4:5): 43.8333	Sequenz (5:5): 100
Sequenz (1:6): 49.8299	Sequenz (2:6): 42.3469	Sequenz (3:6): 48.6395	Sequenz (4:6): 50.6803	Sequenz (5:6): 54.4218
Sequenz (1:7): 43.2056	Sequenz (2:7): 41.8118	Sequenz (3:7): 43.2056	Sequenz (4:7): 43.9024	Sequenz (5:7): 37.2822
Sequenz (1:8): 46.6102	Sequenz (2:8): 43.5811	Sequenz (3:8): 46.9595	Sequenz (4:8): 46.6216	Sequenz (5:8): 41.0473
Sequenz (1:9): 44.7458	Sequenz (2:9): 41.9032	Sequenz (3:9): 44.0135	Sequenz (4:9): 44.0735	Sequenz (5:9): 39.7329
Sequenz (1:10): 46.1017	Sequenz (2:10): 42.404	Sequenz (3:10): 45.1939	Sequenz (4:10): 45.0751	Sequenz (5:10): 40.5676
Sequenz (1:11): 46.1017	Sequenz (2:11): 42.404	Sequenz (3:11): 45.1939	Sequenz (4:11): 45.0751	Sequenz (5:11): 40.5676
Sequenz (1:12): 45.7627	Sequenz (2:12): 42.404	Sequenz (3:12): 45.0253	Sequenz (4:12): 44.7412	Sequenz (5:12): 40.4007
Sequenz (1:13): 46.1017	Sequenz (2:13): 42.404	Sequenz (3:13): 45.1939	Sequenz (4:13): 45.0751	Sequenz (5:13): 40.5676
Sequenz (1:14): 46.1017	Sequenz (2:14): 42.571	Sequenz (3:14): 45.1939	Sequenz (4:14): 44.9082	Sequenz (5:14): 40.4007
Sequenz (1:15): 46.1017	Sequenz (2:15): 40	Sequenz (3:15): 44.688	Sequenz (4:15): 45	Sequenz (5:15): 40.2299
Sequenz (1:16): 46.2712	Sequenz (2:16): 41.1667	Sequenz (3:16): 45.1939	Sequenz (4:16): 44.6667	Sequenz (5:16): 39.3092
Sequenz (1:17): 46.4407	Sequenz (2:17): 39.8333	Sequenz (3:17): 45.8685	Sequenz (4:17): 44.5	Sequenz (5:17): 38.2594
Sequenz (1:18): 44.7458	Sequenz (2:18): 39.4604	Sequenz (3:18): 44.1821	Sequenz (4:18): 44.0135	Sequenz (5:18): 37.9427
Sequenz (1:19): 46.7797	Sequenz (2:19): 41	Sequenz (3:19): 45.3626	Sequenz (4:19): 44.5	Sequenz (5:19): 37.9934
Sequenz (1:20): 45.4237	Sequenz (2:20): 40.5	Sequenz (3:20): 44.5194	Sequenz (4:20): 44.3333	Sequenz (5:20): 37.2323
Sequenz (1:21): 46.1017	Sequenz (2:21): 40.3333	Sequenz (3:21): 45.0253	Sequenz (4:21): 44.3333	Sequenz (5:21): 37.2323
Sequenz (1:22): 45.4237	Sequenz (2:22): 40.3333	Sequenz (3:22): 44.3508	Sequenz (4:22): 44.5	Sequenz (5:22): 36.9028
Sequenz (1:23): 46.6102	Sequenz (2:23): 40.6667	Sequenz (3:23): 45.5312	Sequenz (4:23): 45.5	Sequenz (5:23): 39.1736
Sequenz (1:24): 46.6102	Sequenz (2:24): 39.8333	Sequenz (3:24): 46.543	Sequenz (4:24): 45.3333	Sequenz (5:24): 38.3224
Sequenz (1:25): 42.5424	Sequenz (2:25): 39.3333	Sequenz (3:25): 42.1585	Sequenz (4:25): 42.3333	Sequenz (5:25): 36.7816
Sequenz (1:26): 43.0508	Sequenz (2:26): 40.6667	Sequenz (3:26): 42.1585	Sequenz (4:26): 41.6667	Sequenz (5:26): 36.6174
Sequenz (6:2): 42.3469	Sequenz (7:2): 41.8118	Sequenz (8:2): 43.5811	Sequenz (9:2): 41.9032	Sequenz (10:2): 42.404
Sequenz (6:3): 48.6395	Sequenz (7:3): 43.2056	Sequenz (8:3): 46.9595	Sequenz (9:3): 44.0135	Sequenz (10:3): 45.1939
Sequenz (6:4): 50.6803	Sequenz (7:4): 43.9024	Sequenz (8:4): 46.6216	Sequenz (9:4): 44.0735	Sequenz (10:4): 45.0751
Sequenz (6:5): 54.4218	Sequenz (7:5): 37.2822	Sequenz (8:5): 41.0473	Sequenz (9:5): 40.9015	Sequenz (10:5): 40.5676
Sequenz (6:6): 100	Sequenz (7:6): 39.8955	Sequenz (8:6): 45.2381	Sequenz (9:6): 40.6463	Sequenz (10:6): 42.0068
Sequenz (6:7): 39.8955	Sequenz (7:7): 100	Sequenz (8:7): 36.7596	Sequenz (9:7): 36.2369	Sequenz (10:7): 36.5854
Sequenz (6:8): 45.2381	Sequenz (7:8): 36.7596	Sequenz (8:8): 100	Sequenz (9:8): 38.8514	Sequenz (10:8): 39.8649
Sequenz (6:9): 40.6463	Sequenz (7:9): 36.2369	Sequenz (8:9): 38.8514	Sequenz (9:9): 100	Sequenz (10:9): 98.4975
Sequenz (6:10): 42.0068	Sequenz (7:10): 36.5854	Sequenz (8:10): 39.8649	Sequenz (9:10): 98.4975	Sequenz (10:10): 100
Sequenz (6:11): 42.0068	Sequenz (7:11): 36.5854	Sequenz (8:11): 39.8649	Sequenz (9:11): 98.3306	Sequenz (10:11): 99.8331
Sequenz (6:12): 42.0068	Sequenz (7:12): 36.4111	Sequenz (8:12): 39.8649	Sequenz (9:12): 98.1636	Sequenz (10:12): 99.6661

Sequenz (6:13): 42.0068	Sequenz (7:13): 36.5854	Sequenz (8:13): 39.8649	Sequenz (9:13): 98.3306	Sequenz (10:13): 99.8331
Sequenz (6:14): 41.8367	Sequenz (7:14): 36.5854	Sequenz (8:14): 39.8649	Sequenz (9:14): 97.3289	Sequenz (10:14): 98.8314
Sequenz (6:15): 41.3265	Sequenz (7:15): 36.7596	Sequenz (8:15): 39.3581	Sequenz (9:15): 75.793	Sequenz (10:15): 77.1285
Sequenz (6:16): 42.3469	Sequenz (7:16): 36.9338	Sequenz (8:16): 39.527	Sequenz (9:16): 76.2938	Sequenz (10:16): 77.6294
Sequenz (6:17): 42.517	Sequenz (7:17): 36.9338	Sequenz (8:17): 39.3581	Sequenz (9:17): 64.4407	Sequenz (10:17): 65.6093
Sequenz (6:18): 40.3061	Sequenz (7:18): 36.2369	Sequenz (8:18): 39.1892	Sequenz (9:18): 63.4064	Sequenz (10:18): 64.2496
Sequenz (6:19): 41.6667	Sequenz (7:19): 31.3589	Sequenz (8:19): 40.0338	Sequenz (9:19): 67.1119	Sequenz (10:19): 67.9466
Sequenz (6:20): 40.4762	Sequenz (7:20): 36.5854	Sequenz (8:20): 39.3581	Sequenz (9:20): 66.611	Sequenz (10:20): 67.4457
Sequenz (6:21): 40.8163	Sequenz (7:21): 36.9338	Sequenz (8:21): 39.1892	Sequenz (9:21): 66.9449	Sequenz (10:21): 67.7796
Sequenz (6:22): 41.4966	Sequenz (7:22): 36.9338	Sequenz (8:22): 39.8649	Sequenz (9:22): 68.6144	Sequenz (10:22): 69.9499
Sequenz (6:23): 42.517	Sequenz (7:23): 37.4564	Sequenz (8:23): 39.3581	Sequenz (9:23): 73.9566	Sequenz (10:23): 74.7913
Sequenz (6:24): 43.0272	Sequenz (7:24): 38.1533	Sequenz (8:24): 39.6959	Sequenz (9:24): 63.1052	Sequenz (10:24): 64.1068
Sequenz (6:25): 37.9252	Sequenz (7:25): 35.3659	Sequenz (8:25): 39.527	Sequenz (9:25): 59.2654	Sequenz (10:25): 60.2671
Sequenz (6:26): 39.4558	Sequenz (7:26): 37.2822	Sequenz (8:26): 37.5	Sequenz (9:26): 54.2571	Sequenz (10:26): 54.9249
Sequenz (11:2): 42.404	Sequenz (12:2): 42.404	Sequenz (13:2): 42.404	Sequenz (14:2): 42.571	Sequenz (15:2): 40
Sequenz (11:3): 45.1939	Sequenz (12:3): 45.0253	Sequenz (13:3): 45.1939	Sequenz (14:3): 45.1939	Sequenz (15:3): 44.688
Sequenz (11:4): 45.0751	Sequenz (12:4): 44.7412	Sequenz (13:4): 45.0751	Sequenz (14:4): 44.9082	Sequenz (15:4): 45
Sequenz (11:5): 40.5676	Sequenz (12:5): 41.5693	Sequenz (13:5): 40.5676	Sequenz (14:5): 40.4007	Sequenz (15:5): 40.2299
Sequenz (11:6): 42.0068	Sequenz (12:6): 42.0068	Sequenz (13:6): 42.0068	Sequenz (14:6): 41.8367	Sequenz (15:6): 41.3265
Sequenz (11:7): 36.5854	Sequenz (12:7): 36.4111	Sequenz (13:7): 36.5854	Sequenz (14:7): 36.5854	Sequenz (15:7): 36.7596
Sequenz (11:8): 39.8649	Sequenz (12:8): 39.8649	Sequenz (13:8): 39.8649	Sequenz (14:8): 39.8649	Sequenz (15:8): 39.3581
Sequenz (11:9): 98.3306	Sequenz (12:9): 98.1636	Sequenz (13:9): 98.3306	Sequenz (14:9): 97.3289	Sequenz (15:9): 75.793
Sequenz (11:10): 99.8331	Sequenz (12:10): 99.6661	Sequenz (13:10): 99.8331	Sequenz (14:10): 98.8314	Sequenz (15:10): 77.1285
Sequenz (11:11): 100	Sequenz (12:11): 99.4992	Sequenz (13:11): 99.6661	Sequenz (14:11): 98.6644	Sequenz (15:11): 77.1285
Sequenz (11:12): 99.4992	Sequenz (12:12): 100	Sequenz (13:12): 99.4992	Sequenz (14:12): 98.4975	Sequenz (15:12): 76.7947
Sequenz (11:13): 99.6661	Sequenz (12:13): 99.4992	Sequenz (13:13): 100	Sequenz (14:13): 98.9983	Sequenz (15:13): 77.1285
Sequenz (11:14): 98.6644	Sequenz (12:14): 98.4975	Sequenz (13:14): 98.9983	Sequenz (14:14): 100	Sequenz (15:14): 77.1285
Sequenz (11:15): 77.1285	Sequenz (12:15): 76.7947	Sequenz (13:15): 77.1285	Sequenz (14:15): 77.1285	Sequenz (15:15): 100
Sequenz (11:16): 77.6294	Sequenz (12:16): 77.2955	Sequenz (13:16): 77.6294	Sequenz (14:16): 77.4624	Sequenz (15:16): 85.5263
Sequenz (11:17): 65.6093	Sequenz (12:17): 65.4424	Sequenz (13:17): 65.6093	Sequenz (14:17): 65.4424	Sequenz (15:17): 66.2295
Sequenz (11:18): 64.2496	Sequenz (12:18): 63.9123	Sequenz (13:18): 64.2496	Sequenz (14:18): 64.0809	Sequenz (15:18): 64.0809
Sequenz (11:19): 68.1135	Sequenz (12:19): 67.6127	Sequenz (13:19): 67.9466	Sequenz (14:19): 67.6127	Sequenz (15:19): 65.4605
Sequenz (11:20): 67.6127	Sequenz (12:20): 67.1119	Sequenz (13:20): 67.4457	Sequenz (14:20): 67.2788	Sequenz (15:20): 64.9094
Sequenz (11:21): 67.7796	Sequenz (12:21): 67.4457	Sequenz (13:21): 67.9466	Sequenz (14:21): 67.7796	Sequenz (15:21): 65.5684
Sequenz (11:22): 69.9499	Sequenz (12:22): 69.616	Sequenz (13:22): 69.9499	Sequenz (14:22): 69.783	Sequenz (15:22): 66.2273
Sequenz (11:23): 74.7913	Sequenz (12:23): 74.6244	Sequenz (13:23): 74.7913	Sequenz (14:23): 74.4574	Sequenz (15:23): 73.0579
Sequenz (11:24): 64.1068	Sequenz (12:24): 63.9399	Sequenz (13:24): 64.1068	Sequenz (14:24): 63.9399	Sequenz (15:24): 63.3224
Sequenz (11:25): 60.2671	Sequenz (12:25): 59.9332	Sequenz (13:25): 60.2671	Sequenz (14:25): 60.1002	Sequenz (15:25): 58.1015
Sequenz (11:26): 54.9249	Sequenz (12:26): 54.591	Sequenz (13:26): 54.9249	Sequenz (14:26): 54.7579	Sequenz (15:26): 53.1915

Sequenz (16:2): 41.1667 Sequenz (16:3): 45.1939 Sequenz (16:4): 44.6667 Sequenz (16:5): 39.3092 Sequenz (16:6): 42.3469 Sequenz (16:7): 36.9338 Sequenz (16:8): 39.527 Sequenz (16:9): 76.2938 Sequenz (16:10): 77.6294 Sequenz (16:11): 77.6294 Sequenz (16:12): 77.2955 Sequenz (16:13): 77.6294 Sequenz (16:14): 77.4624 Sequenz (16:15): 85.5263 Sequenz (16:16): 100 Sequenz (16:17): 65.7895 Sequenz (16:18): 64.0809 Sequenz (16:19): 63.3224 Sequenz (16:20): 63.2619 Sequenz (16:21): 64.2504 Sequenz (16:22): 65.2389 Sequenz (16:23): 71.5702 Sequenz (16:24): 62.5 Sequenz (16:25): 58.7171 Sequenz (16:26): 52.7961	Sequenz (17:2): 39.8333 Sequenz (17:3): 45.8685 Sequenz (17:4): 44.5 Sequenz (17:5): 38.2594 Sequenz (17:6): 42.517 Sequenz (17:7): 36.9338 Sequenz (17:8): 39.3581 Sequenz (17:9): 64.4407 Sequenz (17:10): 65.6093 Sequenz (17:11): 65.6093 Sequenz (17:12): 65.4424 Sequenz (17:13): 65.6093 Sequenz (17:14): 65.4424 Sequenz (17:15): 66.2295 Sequenz (17:16): 65.7895 Sequenz (17:17): 100 Sequenz (17:18): 58.8533 Sequenz (17:19): 61.6776 Sequenz (17:20): 60.626 Sequenz (17:21): 59.9671 Sequenz (17:22): 61.285 Sequenz (17:23): 64.4628 Sequenz (17:24): 61.1842 Sequenz (17:25): 53.1148 Sequenz (17:26): 51.6393	Sequenz (18:2): 39.4604 Sequenz (18:3): 44.1821 Sequenz (18:4): 44.0135 Sequenz (18:5): 37.9427 Sequenz (18:6): 40.3061 Sequenz (18:7): 36.2369 Sequenz (18:8): 39.1892 Sequenz (18:9): 63.4064 Sequenz (18:10): 64.2496 Sequenz (18:11): 64.2496 Sequenz (18:12): 63.9123 Sequenz (18:13): 64.2496 Sequenz (18:14): 64.0809 Sequenz (18:15): 64.0809 Sequenz (18:16): 64.0809 Sequenz (18:17): 58.8533 Sequenz (18:18): 100 Sequenz (18:19): 71.3322 Sequenz (18:20): 72.344 Sequenz (18:21): 72.344 Sequenz (18:22): 72.344 Sequenz (18:23): 64.0809 Sequenz (18:24): 59.6965 Sequenz (18:25): 56.3238 Sequenz (18:26): 52.9511	Sequenz (19:2): 41 Sequenz (19:3): 45.3626 Sequenz (19:4): 44.5 Sequenz (19:5): 37.9934 Sequenz (19:6): 41.6667 Sequenz (19:7): 31.3589 Sequenz (19:8): 40.0338 Sequenz (19:9): 67.1119 Sequenz (19:10): 67.9466 Sequenz (19:11): 68.1135 Sequenz (19:12): 67.6127 Sequenz (19:13): 67.9466 Sequenz (19:14): 67.6127 Sequenz (19:15): 65.4605 Sequenz (19:16): 63.3224 Sequenz (19:17): 61.6776 Sequenz (19:18): 71.3322 Sequenz (19:19): 100 Sequenz (19:20): 89.9506 Sequenz (19:21): 89.1269 Sequenz (19:22): 73.3114 Sequenz (19:23): 67.438 Sequenz (19:24): 61.5132 Sequenz (19:25): 56.25 Sequenz (19:26): 53.4539	Sequenz (20:2): 40.5 Sequenz (20:3): 44.5194 Sequenz (20:4): 44.3333 Sequenz (20:5): 37.2323 Sequenz (20:6): 40.4762 Sequenz (20:7): 36.5854 Sequenz (20:8): 39.3581 Sequenz (20:9): 66.611 Sequenz (20:10): 67.4457 Sequenz (20:11): 67.6127 Sequenz (20:12): 67.1119 Sequenz (20:13): 67.4457 Sequenz (20:14): 67.2788 Sequenz (20:15): 64.9094 Sequenz (20:16): 63.2619 Sequenz (20:17): 60.626 Sequenz (20:18): 72.344 Sequenz (20:19): 89.9506 Sequenz (20:20): 100 Sequenz (20:21): 90.4448 Sequenz (20:22): 73.1466 Sequenz (20:23): 66.281 Sequenz (20:24): 60.626 Sequenz (20:25): 56.8369 Sequenz (20:26): 52.5535
Sequenz (21:2): 40.3333 Sequenz (21:3): 45.0253 Sequenz (21:4): 44.3333 Sequenz (21:5): 37.2323 Sequenz (21:6): 40.8163 Sequenz (21:7): 36.9338 Sequenz (21:8): 39.1892 Sequenz (21:9): 66.9449 Sequenz (21:10): 67.7796 Sequenz (21:11): 67.7796 Sequenz (21:12): 67.4457	Sequenz (22:2): 40.3333 Sequenz (22:3): 44.3508 Sequenz (22:4): 44.5 Sequenz (22:5): 36.9028 Sequenz (22:6): 41.4966 Sequenz (22:7): 36.9338 Sequenz (22:8): 39.8649 Sequenz (22:9): 68.6144 Sequenz (22:10): 69.9499 Sequenz (22:11): 69.9499 Sequenz (22:12): 69.616	Sequenz (23:2): 40.6667 Sequenz (23:3): 45.5312 Sequenz (23:4): 45.5 Sequenz (23:5): 39.1736 Sequenz (23:6): 42.517 Sequenz (23:7): 34.8432 Sequenz (23:8): 39.3581 Sequenz (23:9): 73.9566 Sequenz (23:10): 74.7913 Sequenz (23:11): 74.7913 Sequenz (23:12): 74.6244	Sequenz (24:2): 39.8333 Sequenz (24:3): 46.543 Sequenz (24:4): 45.3333 Sequenz (24:5): 38.3224 Sequenz (24:6): 43.0272 Sequenz (24:7): 38.1533 Sequenz (24:8): 39.6959 Sequenz (24:9): 63.1052 Sequenz (24:10): 64.1068 Sequenz (24:11): 64.1068 Sequenz (24:12): 63.9399	Sequenz (25:2): 39.3333 Sequenz (25:3): 42.1585 Sequenz (25:4): 42.3333 Sequenz (25:5): 36.7816 Sequenz (25:6): 37.9252 Sequenz (25:7): 35.3659 Sequenz (25:8): 39.527 Sequenz (25:9): 59.2654 Sequenz (25:10): 60.2671 Sequenz (25:11): 60.2671 Sequenz (25:12): 59.9332

Sequenz (21:13): 67.9466 Sequenz (21:14): 67.7796 Sequenz (21:15): 65.5684 Sequenz (21:16): 64.2504 Sequenz (21:17): 59.9671 Sequenz (21:18): 72.344 Sequenz (21:19): 89.1269 Sequenz (21:20): 90.4448 Sequenz (21:21): 100 Sequenz (21:22): 73.9703 Sequenz (21:23): 66.1157 Sequenz (21:24): 59.9671 Sequenz (21:25): 56.3427 Sequenz (21:26): 53.3773	Sequenz (22:13): 69.9499 Sequenz (22:14): 69.783 Sequenz (22:15): 66.2273 Sequenz (22:16): 65.2389 Sequenz (22:17): 61.285 Sequenz (22:18): 72.344 Sequenz (22:19): 73.3114 Sequenz (22:20): 73.1466 Sequenz (22:21): 73.9703 Sequenz (22:22): 100 Sequenz (22:23): 67.1074 Sequenz (22:24): 61.285 Sequenz (22:25): 57.0016 Sequenz (22:26): 54.0362	Sequenz (23:13): 74.7913 Sequenz (23:14): 74.4574 Sequenz (23:15): 73.0579 Sequenz (23:16): 71.5702 Sequenz (23:17): 64.4628 Sequenz (23:18): 64.0809 Sequenz (23:19): 67.438 Sequenz (23:20): 66.281 Sequenz (23:21): 66.1157 Sequenz (23:22): 67.1074 Sequenz (23:23): 100 Sequenz (23:24): 71.405 Sequenz (23:25): 59.6694 Sequenz (23:26): 54.5455	Sequenz (24:13): 64.1068 Sequenz (24:14): 63.9399 Sequenz (24:15): 63.3224 Sequenz (24:16): 62.5 Sequenz (24:17): 61.1842 Sequenz (24:18): 59.6965 Sequenz (24:19): 61.5132 Sequenz (24:20): 60.626 Sequenz (24:21): 59.9671 Sequenz (24:22): 61.285 Sequenz (24:23): 71.405 Sequenz (24:24): 100 Sequenz (24:25): 54.7697 Sequenz (24:26): 51.9737	Sequenz (25:13): 60.2671 Sequenz (25:14): 60.1002 Sequenz (25:15): 58.1015 Sequenz (25:16): 58.7171 Sequenz (25:17): 53.1148 Sequenz (25:18): 56.3238 Sequenz (25:19): 56.25 Sequenz (25:20): 56.8369 Sequenz (25:21): 56.3427 Sequenz (25:22): 57.0016 Sequenz (25:23): 59.6694 Sequenz (25:24): 54.7697 Sequenz (25:25): 100 Sequenz (25:26): 50.4039
Sequenz (26:2): 40.6667 Sequenz (26:3): 42.1585 Sequenz (26:4): 41.6667 Sequenz (26:5): 36.6174 Sequenz (26:6): 39.4558 Sequenz (26:7): 37.2822 Sequenz (26:8): 37.5 Sequenz (26:9): 54.2571 Sequenz (26:10): 54.9249 Sequenz (26:11): 54.9249 Sequenz (26:12): 54.591 Sequenz (26:13): 54.9249 Sequenz (26:14): 54.7579 Sequenz (26:15): 53.1915 Sequenz (26:16): 52.7961 Sequenz (26:17): 51.6393 Sequenz (26:18): 52.9511 Sequenz (26:19): 53.4539 Sequenz (26:20): 52.5535 Sequenz (26:21): 53.3773 Sequenz (26:22): 54.0362 Sequenz (26:23): 54.5455 Sequenz (26:24): 51.9737 Sequenz (26:25): 50.4039 Sequenz (26:26): 100				

ABCE1 Sequenzalignment

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100																																										
P.furiosus :	-----	MR	IAVIDYDK	NPDK	GHFLC	ERVCP	VNRMG	GEAT	II	IDEEN	YK	-----	I	QEAS	CTG	--	CGIC	CVHK	CP	FAIS	IVNL	PE	:	73																													
P. abyssi :	-----	MVRK	MR	IAVIDYDK	NPDK	GHFLC	ERVCP	VNRMG	GEAT	II	IDEEN	YK	-----	I	QEAS	CTG	--	CGIC	CVHK	CP	FAIS	IVNL	PE	:	77																												
Methanocal :	-----	MKL	GFYLL	GGDFM	RI	AI	IDYDR	CP	PKKS	-ME	CMKY	CP	GVRM	GEAT	II	IDENT	GK	-----	V	ISEVL	CSG	--	CGIC	CVK	CP	FAIS	ITGL	PE	:	84																							
Haloarcula :	-----	MAED	SIA	VVDL	ERCQ	PDRC	N-YE	CMNY	CP	PNRS	GKEC	IV	KREDE	YE	EDE	PF	EGQ	PDQVR	IS	EEIC	LGES	CGIC	CVNK	CP	DAIE	IN	LPQ	:	88																								
Methanosar :	-----	MR	IA	ILNK	DK	CP	RRCS	-KE	CEKY	CB	RVRT	-DE	TI	VF	EDD	GK	P	-----	V	ISEEL	CVG	--	CGIC	IN	CP	DAIM	ITGL	P	:	70																							
Thermoplas :	-----	MV	FMH	VAVL	DKR	CH	PKKH	-HE	CQYY	CP	PVRNH	MA	ID	FP	DP	GQ	P	-----	L	ISETL	CIG	--	CGIC	IRRC	CP	FAIR	IVTL	PD	:	75																							
Pan troglo :	-----	MAD	KL	TR	IA	IVN	HD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	PQSKI	-----	AW	ISETL	CIG	--	CGIC	IKK	CP	FALS	IVNL	PS	:	77																						
Mus muscul :	-----	MAD	KL	TR	IA	IVN	HD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	PQSKI	-----	AW	ISETL	CIG	--	CGIC	IKK	CP	FALS	IVNL	PS	:	77																						
Canis fami :	-----	MAD	KL	TR	IA	IVN	HD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	PQSKI	-----	AW	ISETL	CIG	--	CGIC	IKK	CP	FALS	IVNL	PS	:	77																						
Homo sapie :	-----	MAD	KL	TR	IA	IVN	HD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	PQSKI	-----	AW	ISETL	CIG	--	CGIC	IKK	CP	FALS	IVNL	PS	:	77																						
Rattus nor :	-----	MAD	KL	TR	IA	IVN	HD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	PQSKI	-----	AW	ISETL	CIG	--	CGIC	IKK	CP	FALS	IVNL	PS	:	77																						
Gallus gal :	-----	MAD	KL	TR	IA	IVN	HD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	SQSKI	-----	AW	ISETL	CIG	--	CGIC	IKK	CP	FALS	IVNL	PS	:	77																						
Drosophila :	-----	MSRR	KENE	EVD	KQ	TR	IA	IVS	DD	KCK	PKK	R-QE	CKKT	CP	VVRM	GK	LC	IE	VT	P	TSKI	-----	ASL	ISEEL	CIG	--	CGIC	CVKK	CP	FAIT	II	NLPS	:	85																			
Anopheles :	-----	MSRN	RAAE	ETD	KQ	TR	IA	IVS	DD	KCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVRM	GK	LC	IE	V	AMDSKI	-----	ATL	ISEEL	CIG	--	CGIC	CVKK	CP	FAIT	II	NVPS	:	85																				
ATRL12 :	-----	MAD	RL	TR	IA	IVS	DD	RCK	PKK	R-QE	CKKS	CP	VVK	TG	KL	IE	VT	VGSKL	-----	AF	ISEEL	CIG	--	CGIC	CVKK	CP	FAI	QII	NLPS	:	77																						
Oryza sati :	-----	MSSSS	SGR	SS	RI	AV	VTED	R	CR	PS	KG	-Q	QCR	KR	CP	V	NAT	G	RQ	LC	IE	VT	P	SSRV	-----	SL	ISEEL	CIG	--	CGIC	CVK	CP	DAI	QII	NLPS	:	81																
Caenorhabd :	---	MSR	KG	PLI	K	NN	ETD	V	PL	TR	IA	IV	E	K	D	R	CP	K	N	G	-L	A	C	K	R	CP	V	N	RQ	G	K	Q	LC	IE	V	E	A	T	STI	-----	SQ	ISEIL	CIG	--	CGIC	CVKK	CP	YDA	IKI	II	NLPS	:	88
Kluyveromy :	-----	MSS	KNT	RI	IV	S	ED	KCK	PKK	R-QE	CKRS	CP	VVK	TG	KL	LC	IE	V	M	PTSKI	-----	AF	ISENL	CIG	--	CGIC	CVKK	CP	FAI	QII	NLPT	:	77																				
Eremotheci :	-----	MSD	KNT	RI	IV	S	DD	KCK	PKK	R-QE	CKRS	CP	VVK	TG	KL	LC	IE	V	A	P	TSKI	-----	AF	ISENL																													

	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	*																																																																																																
P.furiosus :	Q	L	E	E	D	-	C	V	H	R	Y	G	V	N	A	F	V	I	R	L	P	V	V	K	E	M	V	V	G	I	V	G	P	N	G	T	G	K	S	T	A	V	K	I	L	A	G	Q	L	I	P	N	I	C	G	D	N	-	-	S	D	G	V	I	R	A	F	R	G	N	E	L	O	N	Y	F	E	K	L	K	N	G	E	I	R	P	V	V	K	P	O	Y	V	D	L	I	P	K	A	V	K	:	175				
P. abyssi :	Q	L	E	D	E	-	C	V	H	R	Y	G	V	N	A	F	V	I	R	L	P	I	V	K	D	M	V	V	G	I	V	G	P	N	G	T	G	K	T	T	A	V	K	I	L	A	G	Q	L	I	P	N	I	C	E	D	N	-	-	S	D	N	V	I	R	A	F	R	G	N	E	L	O	N	Y	F	E	R	L	K	N	G	E	I	R	P	V	V	K	P	O	Y	V	D	L	L	P	K	A	V	K	:	179				
Methanocal :	E	L	S	E	D	K	I	V	H	S	Y	G	O	N	R	F	K	L	F	G	L	V	I	P	R	D	-	G	V	V	G	I	I	G	O	N	G	I	G	K	S	T	V	-	R	I	L	A	G	E	L	I	P	N	I	C	K	H	D	K	E	P	N	Y	D	D	V	I	K	Y	F	R	G	T	E	L	Q	E	Y	F	E	K	L	K	N	K	G	V	K	A	I	H	K	V	O	Y	V	D	I	L	P	K	V	V	K	:	188
Haloarcula :	E	L	T	D	E	-	P	V	H	R	Y	G	E	N	A	F	A	L	Y	G	L	P	S	P	A	E	G	O	V	T	G	I	L	G	P	N	G	I	G	K	T	T	A	V	R	I	L	A	D	E	M	O	P	N	I	C	R	Y	G	E	E	P	S	-	D	E	I	L	D	E	Y	R	G	T	A	L	Q	E	Y	L	E	Q	M	R	G	D	V	D	V	A	R	K	P	O	Y	V	D	R	I	P	N	Q	F	D	:	192	
Methanosar :	E	A	L	Q	E	-	P	T	H	R	Y	G	P	N	G	F	A	L	F	G	L	P	V	P	R	I	C	K	V	T	G	I	L	G	P	N	G	I	G	K	S	T	S	V	O	I	L	S	G	T	L	V	P	N	F	C	O	G	-	-	K	G	D	W	T	V	L	E	H	Y	A	C	T	A	L	H	D	Y	F	K	D	V	D	G	K	V	K	V	S	O	K	P	O	Y	V	D	L	I	P	K	A	F	K	:	172		
Thermoplas :	E	L	N	K	N	-	V	H	R	Y	G	V	N	G	F	R	I	Y	S	L	P	T	V	V	P	C	K	V	S	A	I	L	G	O	N	G	I	G	K	T	T	T	I	N	I	L	S	G	I	T	V	P	N	I	C	N	Y	D	K	P	P	S	K	D	A	V	I	D	R	F	A	R	T	T	M	G	A	Y	F	K	G	L	Y	E	E	N	K	R	A	V	L	K	N	O	Y	V	D	I	P	K	V	S	:	179			
Pan troglo :	N	L	E	K	E	-	T	T	H	R	Y	C	A	N	A	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	D	D	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	D	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	A	K	:	181	
Mus muscul :	N	L	E	K	E	-	T	T	H	R	Y	C	A	N	A	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	D	D	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	D	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	A	K	:	181	
Canis fami :	N	L	E	K	E	-	T	T	H	R	Y	C	A	N	A	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	D	D	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	D	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	A	K	:	181	
Homo sapie :	N	L	E	K	E	-	T	T	H	R	Y	C	A	N	A	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	A	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	D	D	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	D	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	A	R	F	L	R	L	A	K	:	181	
Rattus nor :	N	L	E	K	E	-	T	T	H	R	Y	C	A	N	A	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	D	D	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	D	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	A	K	:	181	
Gallus gal :	N	L	E	K	E	-	T	T	H	R	Y	C	A	N	A	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	D	D	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	D	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	A	K	:	181	
Drosophila :	N	L	E	K	H	-	T	T	H	R	Y	S	K	N	S	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	K	Y	A	N	P	P	D	W	T	E	I	L	S	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	N	L	K	A	L	V	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	V	R	:	189	
Anopheles :	N	L	D	K	H	-	T	T	H	R	Y	S	K	N	S	F	K	L	H	R	L	P	I	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	L	K	P	N	L	C	R	Y	S	D	P	P	D	W	T	D	I	L	A	H	F	R	G	N	E	L	O	N	Y	F	T	K	I	E	D	S	L	R	A	L	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	I	K	:	189	
ATRLI2 :	D	L	E	K	D	-	T	T	H	R	Y	G	A	N	T	F	K	L	H	R	L	P	V	P	R	P	C	Q	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	L	K	P	N	L	C	R	F	T	S	P	P	D	W	Q	E	I	L	T	H	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	R	I	E	D	N	L	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	H	I	P	R	A	V	K	:	181	
Oryza sati :	D	I	D	K	E	-	T	T	H	R	Y	G	P	N	S	F	K	L	H	R	L	P	V	P	R	P	C	Q	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	V	K	P	N	L	C	K	F	T	D	P	P	N	W	D	E	I	M	R	N	F	R	G	S	E	L	Q	K	Y	F	T	R	L	E	D	K	M	K	A	T	M	K	P	O	Y	L	D	H	I	P	K	S	V	T	:	185	
Caenorhabd :	N	L	A	N	E	-	T	T	H	R	Y	S	O	N	S	F	K	L	H	R	L	P	T	P	R	P	C	E	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	N	F	Q	K	E	Q	E	W	T	T	I	N	H	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	R	I	E	D	T	L	K	C	V	I	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	R	A	A	K	:	192		
Kluyveromy :	N	L	D	S	Q	-	V	T	H	R	Y	S	A	N	S	F	K	L	H	R	L	P	T	P	R	P	C	Q	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	R	F	E	D	P	P	E	W	Q	E	I	I	K	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	M	L	E	D	D	I	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	N	I	P	R	A	I	K	:	181
Eremotheci :	N	L	D	S	Q	-	V	T	H	R	Y	S	A	N	S	F	K	L	H	R	L	P	T	P	R	P	C	Q	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	R	Y	D	D	P	P	E	W	S	D	I	I	K	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	M	L	E	D	D	I	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	N	I	P	R	A	I	K	:	181
Saccharomy :	N	L	E	A	H	-	V	T	H	R	Y	S	A	N	S	F	K	L	H	R	L	P	T	P	R	P	C	Q	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	A	G	K	Q	K	P	N	L	C	R	F	D	D	P	P	E	W	Q	E	I	I	K	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	M	L	E	D	D	I	K	A	I	I	K	P	O	Y	V	D	N	I	P	R	A	I	K	:	181
Schizosacc :	N	L	E	S	E	-	V	T	H	R	Y	S	A	N	S	F	K	L	H	R	L	P	T	P	R	P	C	Q	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	S	G	K	M	K	P	N	L	C	R	Y	D	N	P	P	D	W	A	E	V	V	K	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	F	T	K	V	V	E	D	N	I	K	A	L	I	K	P	O	Y	V	D	H	I	P	R	A	I	K	:	181	
Neurospora :	N	L	E	S	Q	-	I	T	H	R	Y	A	A	N	S	F	K	L	H	R	L	P	M	P	R	P	C	N	V	L	G	L	V	G	T	N	G	I	G	K	S	T	A	L	K	I	L	S	G	K	L	K	P	N	L	C	R	Y	D	N	P	P	D	W	E	D	V	I	K	Y	F	R	G	S	E	L	O	N	Y	F	T	K	L	E	D	D	L	K	A	V	V	K	P	O	Y	V	D	Q	I	P	K	A	I	R	:	181	
Plas																																																																																																											

	220	*	240	*	260	*	280	*	300	*				
P.furiosus :	GKVI-----		EL	KKADETGKLEEVKA	LE	ENVLDREIQH	LSGGELQ	RVAI	AAALLRNAT	-FYF	fDEPSSyLDIRORLNAARA	: 253		
P. abyssi :	GKVR-----		EL	KKVDEVGKFEEVVKEL	LE	ENVLDRELHQ	LSGGELQ	RVAI	AAALLRKAH	-FYF	fDEPSSyLDIRORLKVARVI	: 257		
Methanocal :	GKVG-----		DL	KKVDEKGFDEVVEKEL	EL	KNILDRLSQL	SGGELQ	RVAI	AAAYLRNGD	-IYF	fDEPSSyLDIRORFNAARLI	: 266		
Haloarcula :	GKAI-----		EL	DQTDERGALDYLVEQTG	IE	PVVDNHIDDL	SGGELQ	RVAL	VATLARDAD	-FYFL	DEITPYLDIGORMTAARLI	: 270		
Methanosar :	GKTS-----		EL	EKTDERGFLDELIDR	DL	RGVVERKISEL	SGGELQ	RVAI	AACAARDAQ	-FYF	DEISPYLDIYORINVARLV	: 250		
Thermoplas :	GTIG-----		EL	RKKNENGNFDEVVSL	LN	ENALSKDVKEC	SGGELQ	KLAI	IGTTLEKEAD	-IYL	fDEMTSyLDIGERLNVSNIV	: 257		
Pan troglo :	GTVG-----		SI	DRKDETKTQAIVCQQL	DL	THLKERNVEDL	SGGELQ	RFAC	AVVCIQKAD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLKAAITI	: 259		
Mus muscul :	GTVG-----		SI	DRKDETKTQAIVCQQL	DL	THLKERNVEDL	SGGELQ	RFAC	AVVCIQKAD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLKAAITI	: 259		
Canis fami :	GTVG-----		SI	DRKDETKTQAIVCQQL	DL	THLKERNVEDL	SGGELQ	RFAC	AVVCIQKAD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLKAAITI	: 259		
Homo sapie :	GTVG-----		SI	DRKDETKTQAIVCQQL	DL	THLKERNVEDL	SGGELQ	RFAC	AVVCIQKAD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLKAAITI	: 259		
Rattus nor :	GTVG-----		SI	DRKDETKTQAIVCQQL	DL	THLKERNVEDL	SGGELQ	RFAC	AVVCIQKAD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLKAAITI	: 259		
Gallus gal :	GTVG-----		SI	DRKDETKTQTIVCQQL	DL	THLKERNVEDL	SGGELQ	RFAC	AVVCIQKAD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLKAAITI	: 259		
Drosophila :	GAVG-----		DL	DKDERELQTKICEM	DL	SHIRDREIAQL	SGGELQ	RFAI	AMVCIQNA	-IFM	fDEPSSyLDVKORLNAALTI	: 267		
gAnopheles :	GTVG-----		AL	DKKDERKNQMEICDL	DL	THIRDREIQAL	SGGELQ	RFAC	AMVCIQDGD	-IFM	fDEPSSyLDVKORLNCAMTI	: 267		
ATRLI2 :	GNVG-----		EV	DQKDERDKKAELCAD	LE	NQVIDRDVENL	SGGELQ	RFAI	AVVAIQNAE	-IYM	fDEPSSyLDVKORLKAQVV	: 259		
Oryza sati :	GKVG-----		DL	SKKDERHMKNLCDTLE	LN	QVLDRDVSAL	SGGELQ	RFAI	AARAMEEAD	-VYM	fDEPSSyLDVKORLKAQVI	: 263		
Caenorhabd :	GTVE-----		KN	TRKHDNDNLNSVIDQME	LR	GLLDREIDQL	SGGELQ	RFAI	AMCCVQKAD	-VYM	fDEPSSyLDVKORLKAATII	: 270		
Kluyveromy :	GPVQKVGE-----		LLK	RLKESKDDAKRYIDI	IL	KNVLNREVSAL	SGGELQ	RFAI	GMSCVQEAD	-VYM	fDEPSSyLDVKORLNAALII	: 264		
Eremotheci :	GPLQKVGE-----		LLK	ARMEKPEADVVKMYIKI	EL	QNVLRDVSAL	SGGELQ	RFAI	GMSCVQQAN	-VYM	fDEPSSyLDVKORLNAALII	: 264		
Saccharomy :	GPVQKVGE-----		LLK	RMEKSPEDVKRYIKI	QL	ENVLRDIEKL	SGGELQ	RFAI	GMSCVQEAD	-VYM	fDEPSSyLDVKORLNAQII	: 264		
Schizosacc :	TGDKTVSG-----		LI	KARANNN	-N	FEEVMDHTDL	QNL	LNRE	VGHLSGGELQ	RFAI	AAVATQKAD	-VYM	fDEPSSyLDIKORLKAGRVI	: 262
Neurospora :	TPDKSVKF-----		LI	EG--RRSLDNLDEVLD	TE	RHIYDRDVTLL	SGGELQ	RFAI	GTVCVQKAD	-VYM	fDEPSSyLDVKORLSAARI	: 262		
Plasmodium :	GNIL-----		EI	INKKDKFNQKDKYIAEL	DL	EHLLDRNVEDL	SGGELQ	RFALL	MSIIGQSTNVYMF	fDEPSSyLDIKORISMAKII	: 274			
Encephalit :	KRFSPEVKSMVKSLSLDGTETD	T	DNRL	LVRSVLEEMDQRQRKDYI	IE	KMCI	GNILDR	DVEEL	SGGELQ	RLSLALACMQQSD	-VYI	fDEPSSyLDVKORLSAAKEI	: 287	
Sulfolobus :	GTVN-----		EI	TKIDERGKKDEVKEL	LN	MTNLWNKDANI	LSGGELQ	RL	LVAA	SLREAD	-VYI	fDEPSSyLDVRBRMNAKAI	: 255	
Nanoarchae :	GKTVR-----		EL	IKLDNPLLKKEFG	DK	IILDKIEN	LSGGELQ	KL	LIYASLSKEGD	-VYI	fDEPTNFLDIRERLRVALKI	: 249		

g

1

1 1

r

1SGGELQr a

a

fDEPssyLD qRl a i

	320	*	340	*	360	*	380	*	400	*	420			
P.furiosus :	RRLSEE-GKSVL	VVEHDL	AVLDYLS	DIHVVYGE	PGVYGIF	SKPKGTRNG	INEFLRC	GYLKDEN	VFRFPY	-----E--IKFT-----	KTGERVEIERETLV	: 340		
P. abyssi :	RRLANE-GKAVL	VVEHDL	AVLDYLS	VIHVVYGE	PGVYGIF	SKPKGTRNG	INEFLRC	GYLKDEN	VFRFPY	-----E--IRFT-----	KLSEKRVDERETLV	: 344		
Methanocal :	RELN----	KVVVVEHDL	IVLDYLS	DIHIMYGV	PSAYGIVSM	PKSVRVG	INEYLYC	ELREENIR	FRKE-----	P--IIFE-----	KRAVIDFKNRPILL	: 349		
Haloarcula :	RELAEEDRSML	VVEHDL	AILDL	ADNINVAYG	TPGARGVITP	PKSTKKG	INEYLYC	YLENENM	IRQT-----	D--IEFE-----	EHAPRSASQGDVVI	: 358		
Methanosar :	QEISK--	DRAVL	VVEHDL	AILDML	TVIHIAYGE	PAGFGVITL	PKSVRVG	INQYLYC	YLPEENIR	IRPE-----	A--IRFE-----	VHPPREDAQFQSMV	: 336	
Thermoplas :	QDLISK--	KKTVI	VVEHDL	AILDWL	ADSVNIVYGD	PGVYGIF	SEPLSTNRA	INAYLSC	FLREENV	IRSY-----	P--IEFE-----	EKSSKRDKFEHILI	: 343	
Pan troglo :	RSLINP-DRYII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	SAYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	YVPTENL	RFRD-----	ASLVFK--VAET--	ANEEEVKKMC	: 346	
Mus muscul :	RSLINP-DRYII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	SAYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	YVPTENL	RFRD-----	ASLVFK--VAET--	ANEEEVKKMC	: 346	
Canis fami :	RSLINP-DRYII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	SAYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	YVPTENL	RFRD-----	ASLVFK--VAET--	ANEEEVKKMC	: 346	
Homo sapie :	RSLINP-DRYII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	SAYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	YVPTENL	RFRD-----	ASLVFK--VAET--	ANEEEVKKMC	: 346	
Rattus nor :	RSLINP-DRYII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	SAYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	YVPTENL	RFRD-----	ASLVFK--VAET--	ANEEEVKKMC	: 346	
Gallus gal :	RSLINP-DRYII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	SAYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	YVPTENL	RFRD-----	ASLVFK--VAET--	ANEEEVKKMC	: 346	
Drosophila :	RSLLHP-TKFII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	GCYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	FVPTENM	RFRD-----	ESLTFK--VSES--	ATEEEIKRMN	: 354	
Anopheles :	RSLIHP-DKFII	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	VP	GCYGVVTM	PFSVREG	INIFLDG	FVHTENM	RFRD-----	ESLTFK--VSES--	ASEEEIKRTC	: 354	
ATRLI2 :	RSLLRP-NSYVI	VVEHDL	SVLDYLS	DFICCLYG	KPGAYGVVT	L	PFSVREG	INIFLAG	FVPTENL	RFRD-----	ESLTFK--VAETP	QESAEIISYA	: 348	
Oryza sati :	RSLLQP-KNYVI	VVEHDL	SILDYLS	DIICCLYGT	PGAYGVVT	L	PSSVREG	INIFLDG	FIPTENL	RFRD-----	EKLTFR--VTES--	TEEIVEGQTYQ	: 351	
Caenorhabd :	RERVSD-TNYVV	VVEHDL	AVLDYLS	DFICCLYG	VP	GVYGVVT	L	PSGVREG	INMFL	EGFIRTE	NMFRD-----	SKLSFKTSEQ	: 355	
Kluyveromy :	RSLINP-TTYVIC	VEHDL	SVLDYLS	DFVCIYGV	PSVYGVVT	L	PSSVREG	INIFLDG	HIPSEN	LFRD-----	EALQFR---MADAG	DELEAD-ASR	: 351	
Eremotheci :	RSLLDP-TTYVIC	VEHDL	SVLDYLS	DFICILYGV	PSVYGVVT	L	PSSVREG	INIFLDG	HIPSEN	LFRD-----	EALQFR---LAEAGE	EELHSD-AMR	: 351	
Saccharomy :	RSLLAP-TKYVIC	VEHDL	SVLDYLS	DFVCIYGV	PSVYGVVT	L	PASVREG	INIFLDG	HIPAE	NLFRD-----	EALQFR---IADATED	LQNDASAR	: 352	
Schizosacc :	RSLLAT-TNYVI	VVEHDL	SVLDYLS	DFVCVLYGV	PSMYGVVT	L	PYSVREG	INIFLDG	HIPTEN	LFRS-----	EALTFR---LADAS	DEITAD-RTA	: 349	
Neurospora :	RSLLRP-DDYVI	VVEHDL	SVLDYLS	DFVCCLYG	QPAVYGVVT	L	PHSVREG	INIFLDG	HIPTEN	LFRD-----	ESLTFR---IAEGTE	EFIQE-KSR	: 349	
Plasmodium :	HKLVKH-DNYII	VVEHDL	SILDYLS	DFVCCLVG	KAGAYGVVT	C	PFSVREG	INIFLDG	FVPTDN	LFRD-----	ESLNFK---LATDQ	DATDEKRLH	: 363	
Encephalit :	RELCED-NSYVI	VVEHDL	AILDLMS	DFGCVLYG	QSGAYGV	ITA	PYAIKSA	INIFLDG	YIPTEN	MFRP-----	SELKFDIS-----	ERPTRDAEKRA	: 373	
Sulfolobus :	RELLKN--KYVIV	VVEHDL	IVLDYLS	DIHIIYGE	SSVYGRVSK	SYAAR	VGINN	FLKCYL	PAENMK	IRPDEIK	FMLKEVS-----	DLDLSKDLKT	: 342	
Nanoarchae :	KALNKT----	KIVID	HDL	LILDY	IVELI	HIAYG	QKAAYG	KFSQ	PKGNNTA	INEYLYC	GYLKSE	NIIRDF-----	ELYFLEGTEKERGKTI	: 330

r l vveHDL LDylsd yG p yG p r gIN fL G eN r R

		*	440	*	460	*	480	*	500	*	520								
P.furiosus	:	TYPRLVKDYGSF--RLEVEP	GEIKKG	EVIGIVGPNCT	GKTTFFVKMLAG	VEEPT	EG---KIEWDLTVAYKPOY	KADYEGTVYE	LSKIDASKLNSNFYKTELLK	:	439								
P. abyssi	:	EYPRLVKDYGSF--KLEVEP	GEIRKG	EVIGIVGPNCT	GKTTFFVKMLAG	VEEPT	EG---KVEWDLTVAYKPOY	KAHEYEGTVYE	LSKIDSSKLNSNFYKTELLK	:	443								
Methanocal	:	SYSSMKKTLGDF--KLEVSG	GTTIYKGE	EVIGILGPNCT	GKTTFFVKMLAG	VIKPD	EGEV--IKEGDIKVS	YKPOYT	TPDYDGTVED	LLSSITN--IH	TSYYKSEIIN	: 448							
Haloarcula	:	EYPELQKSYGDGE	FSLDVEAG	TIRESE	VLGVVGPNCIGKST	FAKMLAG	RL	EP	TAG---EIDTSLDIAYKPOY	EIDQPMR	VD	AF	L	ASITDD-FGSSYWNTEIAQ	: 458				
Methanosar	:	SFNSFSKQYGDG-	FSLKATG	GSLREG	EVLGIVGPNCT	GKSTFVKVLAGE	EIKPD	EG---	DPGIEVKIS	YKPOYT	KADTPVSVQDF	LRGITKR-FG	TSY	EVEIAN	: 435				
Thermoplas	:	TWTDIKKKLGDF--SLDVHAG	QIHTGE	ISGVLGRNALGKST	FVMMLAG	VMNP	DEG---	SISQNVKVS	YKPOYT	STDFKGT	VSD	L	ASAL	KDRAEDTYVKNEIFH	: 442				
Pan troglo	:	MYKYPGMKKKMGE	FELAIVA	GEFTDSEIMVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RLKP	DEG---	GEVPVLNVS	YKPOKT	SPKSTG	SVRQLL	HEKIR	DAYTHPQFVTDVMK	: 447				
Mus muscul	:	MYKYPGMKKKMGE	FELAIVA	GEFTDSEIMVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RLKP	DEG---	GEVPVLNVS	YKPOKT	SPKSTG	SVRQLL	HEKIR	DAYTHPQFVTDVMK	: 447				
Canis fami	:	MYKYPGMKKKMGE	FELAIVA	GEFTDSEIMVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RLKP	DEG---	GEVPVLNVS	YKPOKT	SPKSTG	SVRQLL	HEKIR	DAYTHPQFVTDVMK	: 447				
Homo sapie	:	MYKYPGMKKKMGE	FELAIVA	GEFTDSEIMVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RLKP	DEG---	GEVPVLNVS	YKPOKT	SPKSTG	SVRQLL	HEKIR	DAYTHPQFVTDVMK	: 447				
Rattus nor	:	MYKYPGMKKKMGE	FELAIVA	GEFTDSEIMVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RLKP	DEG---	GEVPVLNVS	YKPOKT	SPKSTG	SVRQLL	HEKIR	DAYTHPQFVTDVMK	: 447				
Gallus gal	:	MYKYPGMKKKMGE	FELSIVA	GEFTDSEIMVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RLTP	DEG---	GEVPILNVS	YKPOKT	SPKSTG	SVRQLL	HEKIR	DAYTHPQFVTDVMK	: 447				
Drosophila	:	HYVYPAMVKT	LGKFE	LTV	EKGHFS	DSSEILVLLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	NLQPD	GE---	VELPMLNIS	YKPOKT	SPKFQNHVRH	LHDKIR	DAYVHPQFIADVMK	: 455			
Anopheles	:	HYLYPKMKKRLGS	FTLT	INDGQF	SDSEIIVLLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	NLEP	DEES---	EPLPVLNIS	YKPOKT	SPKSQST	VRYL	LHEKIR	DAYIHPQFVADVMK	: 456			
ATRLI2	:	RYKYPTMTKTQGN	FRLRV	SEGEFTDSQ	IIIVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	LLKPD	DT	EGPDREI	PEFNVS	YKPOKT	SPKFQNS	VRHL	LHQKIR	DSYMHPQFMSDVMK	: 453		
Oryza sati	:	CYRYPTMTKTRCG	FKLSV	TEGSFND	SQIIIVMLG	ENG	TGKTTFIRMLAG	RVKPD	KVGDEE	VDVPEYTVSYKPOELISKYSSTVRDL	LFEK	VP	GSCTQAQ	FRSDVMK	: 456				
Caenorhabd	:	NIKYPMSKTLGN	FHL	DVEAGDF	SDSEIIVMLG	ENG	TGKTTMIKMMAG	SLKP	PEDEN---	TELP	HVSIS	YKPOKT	SPKSET	TVRFMLHDKIQN	MYEHPQFKTDVMN	: 457			
Kluyveromy	:	AFTYPMKRTQGD	FSLT	VEAGEF	SDSQILVMMG	ENG	TGKTTLIKLAG	AIPADD	GQ---	DIPKLNVS	SMKPQKT	APKFT	GT	VRQL	FFKRI	RAQFLNPQFQTDVVK	: 452		
Eremotheci	:	AFQYPPMKRTQGD	FVLN	VEPEGF	SDSEILVMMG	ENG	TGKTTLIKLAG	AIAADD	GK---	DIPKLNVS	SMKPQKT	APKF	PGT	VRQL	FFKRI	RAQFLNPQFQTDVCK	: 452		
Saccharomy	:	AFSYPSLKTQGD	FVLN	VEEGEF	SDSEILVMMG	ENG	TGKTTLIKLAG	ALKP	DEGQ---	DIPKLNVS	SMKPQKT	APKF	PGT	VRQL	FFKKIR	GQFLNPQFQTDVVK	: 453		
Schizosacc	:	EYNYPDHVIEQGD	FKLTI	KSGG	FSDA	SEIIVLLG	ENG	TGKTTFC	KWMAKNS-----DLKIS	SMKPQT	APKF	QGT	VRML	FLKKIR	AAFLNGKFQSEVCK	: 441			
Neurospora	:	AFKYPAMEKTMGN	FHLS	IDAGSF	SDSEIIVMMG	ENG	TGKTTFCRLAG	VLKPD	GTK---	RVPEMKIS	SMKPQT	TPKF	EGT	VRQL	FFKKIK	AAFLSPQFQTDVVK	: 450		
Plasmodium	:	FYNYPTMVKT	LNLS	FSLT	IDKGF	SESEIFVLLG	QNGSGKSTFIR	L	FAGLIKPD	NLES-LSFLES	LSVS	YKPOQT	QAKFT	GT	VRQL	LMSKLKGLYNDPYFNNEIIK	: 467		
Encephalit	:	QYWYGGMTKTYES	FRLEV	KEGSF	SDSEIIVFLG	ENG	MGKTTLVGLIAG	LIKPD	RGD---	EFTKLSY	SLKPQKT	LPKY	KG	TVRE	LFMSKIR	SSFM	DQSEFVNDVIK	: 474	
Sulfolobus	:	KMKWTKIIKKLGD	FQLV	VDN	GEA	KEGEIIGILG	PNCTGKTTFARI	VGEIT	AD	EGS---VTPEK	QILSYKPOKT	FPNYD	GT	VQ	QYLEN	ASKDALSTSSWFF	E	EVT	: 444
Nanoarchae	:	YLEWKPTIDLGNE	FKLEA	EGE	VYKKEIIGIVG	PNCTGKTTFIRAL	KGDFD	V	KPIEK-----KITIS	YKPOYT	EPK--E	VT	VR	KL	FEQ	MNP	NYRNEFYDSLLIR	: 427	

f L G ei G Ng GKtTf lag p s KPQ i v l

	*	540	*	560	*	580	*	600	*	620	*	
P.furiosus :	P-LGIIDLYDREVNELSGGELQ	VAIAATLLRDADIYLLDEPSAYLD	VEQRLAVSRAIRHLM	MEKNEKTALVVEHDVLMIDYVSDRLMVFE	EGEP	GKYGRALPPMGM	:	543				
P. abyssi :	P-LGIIDLYDRNVEDLSGGELQ	VAIAATLLRDADIYLLDEPSAYLD	VEQRLAVSRAIRHLM	MEKNEKTALVVEHDVLMIDYVSDRLIVFE	EGEP	GRHGRALPPMGM	:	547				
Methanocal :	P-LQLEKLLDREVRELSGGELQ	VAIAACLSRDADIYLLDEPSAF	LDVEQRLRVSKVIRRIADEKEAGMFVVD	HDILFQDYISDRFTVFSGE	EP	GKFGVGSSPMNK	:	552				
Haloarcula :	P-LQLESVMEQQLTDLSGGERQ	VAIAACLSKDADIYLLDEPSA	HLDEVEQRMVATSARRYAENHDATAMVID	HDIIYIMIDLLADRLIVFDGE	PAKNGHAAPPQGM	:	562					
Methanosar :	P-LQLERIYESLLTELSSGGELQ	VAIAACLSQEADLIYLLDEPSA	HLDEVEQRMVTKVINRFAENNQKTAMVVD	HDIIYIMIDMLSORLLVFE	GKPSVYGEAHGPF	FSM	:	539				
Thermoplas :	P-LNIPDIMENPVDGLSGGEMQ	RLSIAITLSREADVYLLDEPSA	HLDSYRMVVAKVIRRVMENTKKTALVVD	HDIIYLIDLISPSLIVFSGE	PGSHGASDGPMDM	:	546					
Pan troglo :	P-LQIENIIDQEVQTLSSGGELQ	VALALCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLMAARVVKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGVP	SKNTVANSPQTL	:	551				
Mus muscul :	P-LQIENIIDQEVQTLSSGGELQ	VALALCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLMAARVVKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGVP	SKNTVANSPQTL	:	551				
Canis fami :	P-LQIENIIDQEVQTLSSGGELQ	VALALCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLMAARVVKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGVP	SKNTVANSPQTL	:	551				
Homo sapie :	P-LQIENIIDQEVQTLSSGGELQ	VRRLRLCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLMAARVVKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGVP	SKNTVANSPQTL	:	551				
Rattus nor :	P-LQIENIIDQEVQTLSSGGELQ	VALALCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLMAARVVKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGVP	SKNTVANSPQTL	:	551				
Gallus gal :	P-LQIENIIDQEVQTLSSGGELQ	VALALCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLMAARVMKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGVP	SKNTVANSPQTL	:	551				
Drosophila :	P-MKIEEIMDQEVQNLSSGGELQ	VALVLCCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEQRLVAAKVIKRYILHAKKTGFVVE	HD	FIMATYLADRVIVIEGQPSVKTTAFSPQSL	:	559					
Anopheles :	P-LKIEEIMDQEVQNLSSGGELQ	VALVLCCLGKPADVYLLDEPSA	YLDSEORLIAAKVIKRYILHAKKTGFVVE	HD	FIMATYLADRVIVFEGQPSVDTTAHTPQSL	:	560					
ATRLI2 :	P-LQIEQLMDQEVVNLSSGGELQ	VALTLCLGKPADIYLLDEPSA	YLDSEQRIVASKVIKRFILHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVIVYEGQPSIDCTANCPQSL	:	557					
Oryza sati :	P-LKIEQLMDRQVPTLSSGGELQ	VALCLCLGKPADIYLLDEPSA	YLDSEORLLAAKVIKRFILHEKKTAFVVE	HD	FIMATYLADKVIVFEGKPSVDCIANAPEPL	:	560					
Caenorhabd :	P-LMMEQLLDRNVKELSSGGELQ	VALALCLGKTASLYLLDEPSA	YLDSEQRLHAAKVIKRFIMHAKKTAFVVE	HD	FIMATYLADRVVVFEGQPSVKCTACKPQSL	:	561					
Kluyveromy :	P-LKIDDIIDQEVQHLSSGGELQ	VAIVLSLGMNADIYLLDEPSA	YLDSEQRIIICSKVIRRFILHNKKTAFIVE	HD	FIMATYLADKVIVFDGIPSKQAFARAPESL	:	556					
Eremotheci :	P-LRIDDIIDQEVQHLSSGGELQ	VAIVLALGIPADIYLLDEPSA	YLDSEQRIIICSKVIRRFILHNKKTAFIVE	HD	FIMATYLADKVIVFEGIPSKNAHARAPESL	:	557					
Saccharomy :	P-LSIDNIIDQEVNLSSGGELQ	VAICLALGMPADVYLLDEPSA	YLDSEQRIIASKVIRRFIVNSRKTAFIVE	HD	FIMATYLADRVILFEGQPSRDARCNPQSL	:	545					
Neurospora :	P-LKLDDFIDQEVKHLSSGGELQ	VAIVLALGIPADIYLLDEPSA	YLDSEQRIIASKVIRRFIVNSRKTAFIVE	HD	FIMATYLADRVIVFDGKGIGIDAHANKPESL	:	554					
Plasmodium :	P-LKTESILDNQVLTLSGGELQ	KVAIIVTLAKNTNIYLLDEPSA	YLDSEQRIIVSKIIKRFILNTNKTAFIVE	HD	FIMATYLADHVIIVFDGQAGVNTVANTPQTL	:	571					
Encephalit :	P-LSIEYTYEQVQNLSGGELQ	RIAIAMCLGKDANVYLLDEPSA	FLDSDORIAISKIIKRFIYSNGKTAFIVE	HD	LIVGTYLADKVIVFQEGEPGVSSVASPPMGL	:	578					
Sulfolobus :	KRLNLHRLLESNVNDLSGGELQ	KLYIAATLAKEADLYVLDEPS	SYLDVEERYIVAKAIKRVTRERKAVTFIID	HDLSIHDIADRIIVFKGEPEKAGLATSPVTL	:	549						
Nanoarchae :	P-LELYELFDHDLTTLSSGGELQ	KVITAAALLKEADLYLDEPTA	FLDIIEERVRIARAIRNIIKEKGAAAFVID	HDLMFMEYISDSIMVFE	GEPEPSKYGKANKPLPI	:	531					
	p l	d v	LSGGELQrva	L	ad Yl	DEPSa LD	eqR	r	ktaf v	HD	m y	d vf G p a P

	640	*	660	*	680	
P.furiosus :	REGMNRFLASIGITFRRDPDTGRPRANK	EGSVKDRE	OKKEGEY	YYIA-----	: 590	
P. abyssi :	REGMNRFLASVGITFRRDPDSGRPRANK	EGSVKDRE	OKARGEY	YYA-----	: 593	
Methanocal :	RDGANKFLKEMQITFRRDEETGRPRANK	EGSQRDLM	OKKEGEY	YYVDE-----	: 600	
Haloarcula :	REGMNEFLQNLDITFRRDEERTSRPRINK	PDSQLDRE	OKNAGEY	YYAP-----	: 609	
Methanosar :	ESGMNRFLLENLGITFRRDEETRRPRVNNL	GSRLDRE	OKESGNY	YYSAKD----	: 588	
Thermoplas :	KEGMNRFLKMGVTFRRDQSSNRPRINK	KGSSLDRL	OKENRY	YYA-----	: 592	
Pan trogl :	LAGMNFLSQLEITFRRDPNNYRPRINK	LNSIKDVE	OKKSGNY	FFLDD-----	: 599	
Mus muscul :	LAGMNFLSQLEITFRRDPNNYRPRINK	LNSIKDVE	OKKSGNY	FFLDD-----	: 599	
Canis fami :	LAGMNFLSQLEITFRRDPNNYRPRINK	LNSIKDVE	OKKSGNY	FFLDD-----	: 599	
Homo sapie :	LAGMNFLSQLEITFRRDPNNYRPRINK	LNSIKDVE	OKKSGNY	FFLDD-----	: 599	
Rattus nor :	LAGMNFLSQLEITFRRDPNNYRPRINK	LNSIKDVE	OKKSGNY	FFLDD-----	: 599	
Gallus gal :	LAGMNFLSQLEITFRRDPNNYRPRINK	LNSIKDVE	OKKSGNY	FFLDD-----	: 599	
Drosophila :	LNGMNRFLLELLGITFRRDPNNFRPRINK	NNSVKDTE	OKRSGQF	FFLEDEACN-	: 611	
Anopheles :	LNGMNRFLLELLEITFRRDPNNFRPRINK	LNSVKDTE	OKRAGQY	FFYEE-----	: 608	
ATRLI2 :	LSGMNLFSLHLNITFRRDETNFRPRINK	LESTKDRE	OKSAGSY	YYLDD-----	: 605	
Oryza sati :	ASGMNRFLSHLDVTFRKDPTTYRPRINK	LGSIKDAE	OKAAGCY	YYLEY-----	: 608	
Caenorhabd :	LEGMNRFLKMLDITFRRDQETYPRI	NKLD	SVKDV	OKKSGQF	FFLDDN----	: 610
Kluyveromy :	LTGCNKFLKNLNVTFRRDPTSFRPRINK	LDSQMDKE	OKSSGNY	FFLDHNGV--	: 607	
Eremotheci :	LTGCNKFLKNLNVTFRRDPSFRPRINK	LDSQMDKE	OKLSGNY	FFLDTASV--	: 607	
Saccharomy :	LTGCNRFLKNLNVTFRRDPSFRPRINK	LDSQMDKE	OKSSGNY	FFLDNTGI--	: 608	
Schizosacc :	LTGMNTFLKNLDVTFRRDENTLPRINK	FDSQMDQ	EOKNAGNY	FFLEN-----	: 593	
Neurospora :	LTGCNTFLKNLDVTFRRDPTNYRPRINK	LNSQLDQ	EOKLSGNY	FFLDDPEKSS	: 607	
Plasmodium :	AAGMNFCLKIIDVTFRRDESNYRPRINK	YDSVKDKE	OKLNGTY	FIIDE-----	: 619	
Encephalit :	LDGMNIFLKSVDVTFRRDSSNLRPRV	NKPGSAKD	RIOKENN	QYFFS-----	: 624	
Sulfolobus :	KTGMNEFLRELEVTFRRDAETGRPRV	NKIGSYLD	RVOKER	CDYYS	SMVLSTQ--	
Nanoarchae :	KEGLNLFCLKNMGITFR--KVNGRPR	INEPGSRL	DREOKA	QGLYY	-----	
	G N FL	TfRrd	RPR Nk	S D eQK	g y	

8. Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P. and A. G. Leslie (1996). "Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **52**(Pt 1): 30-42.
- Adman, E. T., L. C. Sieker, et al. (1973). "Structure of a bacterial ferredoxin." J Biol Chem **248**(11): 3987-96.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Annilo, T., Z. Q. Chen, et al. (2003). "Evolutionary analysis of a cluster of ATP-binding cassette (ABC) genes." Mamm Genome **14**(1): 7-20.
- Aravind, L., L. M. Iyer, et al. (2004). "A novel family of P-loop NTPases with an unusual phyletic distribution and transmembrane segments inserted within the NTPase domain." Genome Biol **5**(5): R30.
- Beinert, H., R. H. Holm, et al. (1997). "Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures." Science **277**(5326): 653-9.
- Bertini, I., S. Ciurli, et al. (1995). "The electronic structure of FeS centers in proteins and models. A contribution to the understanding of their electron transfer properties." Structure and Bonding **83**: 1-53.
- Bes, M. T., E. Parisini, et al. (1999). "Crystal structure determination at 1.4 Å resolution of ferredoxin from the green alga *Chlorella fusca*." Structure **7**(10): 1201-11.
- Bisbal, C., C. Martinand, et al. (1995). "Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway." J Biol Chem **270**(22): 13308-17.
- Bisbal, C., T. Salehzada, et al. (2001). "The 2-5A/RNase L pathway and inhibition by RNase L inhibitor (RLI)." Methods Mol Biol **160**: 183-98.
- Blackwell, L. J., K. P. Bjornson, et al. (1998). "DNA-dependent activation of the hMutS α ATPase." J Biol Chem **273**(48): 32049-54.
- Blow, D. (2002). "Outline of Crystallography for Biologists " Oxford University Press, New York.
- Britt, R. D., K. Sauer, et al. (1991). "Electron spin echo envelope modulation spectroscopy supports the suggested coordination of two histidine ligands to the Rieske Fe-S centers of the cytochrome b6f complex of spinach and the cytochrome bc1 complexes of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* R-26, and bovine heart mitochondria." Biochemistry **30**(7): 1892-901.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **54**(Pt 5): 905-21.
- Buettner, K. (2003). "Diploma Thesis."
- Carney, J. P., R. S. Maser, et al. (1998). "The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response." Cell **93**(3): 477-86.
- Chan, M. K., J. Kim, et al. (1993). "The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures." Science **260**(5109): 792-4.
- Chen, J., G. Lu, et al. (2003). "A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle." Mol Cell **12**(3): 651-61.
- Chen, Z. Q., J. Dong, et al. (2006). "The Essential Vertebrate ABCE1 Protein Interacts with Eukaryotic Initiation Factors." J Biol Chem **281**(11): 7452-7.

- Cupp-Vickery, J. R., H. Urbina, et al. (2003). "Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*." J Mol Biol **330**(5): 1049-59.
- De la Fortelle, E., Bricogne, G. (1997). "SHARP: A Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement Program for the MIR and MAD Methods." Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography **276**: 472-494.
- Dean, M., A. Rzhetsky, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-66.
- Deng, Y. J., Z. X. Huang, et al. (2006). "Gene profiling involved in immature CD4+ T lymphocyte responsible for systemic lupus erythematosus." Mol Immunol **43**(9): 1497-507.
- Diederichs, K., J. Diez, et al. (2000). "Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*." Embo J **19**(22): 5951-61.
- Djaman, O., F. W. Outten, et al. (2004). "Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*." J Biol Chem **279**(43): 44590-9.
- Dobritzsch, D., S. Ricagno, et al. (2002). "Crystal structure of the productive ternary complex of dihydropyrimidine dehydrogenase with NADPH and 5-iodouracil. Implications for mechanism of inhibition and electron transfer." J Biol Chem **277**(15): 13155-66.
- Dobritzsch, D., G. Schneider, et al. (2001). "Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil." Embo J **20**(4): 650-60.
- Dong, J., R. Lai, et al. (2004). "The essential ATP-binding cassette protein RLII functions in translation by promoting preinitiation complex assembly." J Biol Chem **279**(40): 42157-68.
- Drenth, J. (1999). "Principles of Protein X-Ray Crystallography." Springer-Verlag, Heidelberg.
- Duee, E. D., E. Fanchon, et al. (1994). "Refined crystal structure of the 2[4Fe-4S] ferredoxin from *Clostridium acidurici* at 1.84 Å resolution." J Mol Biol **243**(4): 683-95.
- Erdmann, R., F. F. Wiebel, et al. (1991). "PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases." Cell **64**(3): 499-510.
- Estevez, A. M., S. Haile, et al. (2004). "Effects of depletion and overexpression of the *Trypanosoma brucei* ribonuclease L inhibitor homologue." Mol Biochem Parasitol **133**(1): 137-41.
- Fetsch, E. E. and A. L. Davidson (2002). "Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9685-90.
- Frey, M., L. Sieker, et al. (1987). "Rubredoxin from *Desulfovibrio gigas*. A molecular model of the oxidized form at 1.4 Å resolution." J Mol Biol **197**(3): 525-41.
- Fritz, G., A. Roth, et al. (2002). "Structure of adenylylsulfate reductase from the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* at 1.6-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1836-41.
- Fukuyama, K., T. Okada, et al. (2002). "Atomic resolution structures of oxidized [4Fe-4S] ferredoxin from *Bacillus thermoproteolyticus* in two crystal forms: systematic distortion of [4Fe-4S] cluster in the protein." J Mol Biol **315**(5): 1155-66.

- Gasteiger E., H. C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005)). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server." The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press: 571-607.
- Gaudet, R. and D. C. Wiley (2001). "Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing." Embo J **20**(17): 4964-72.
- Gavin, A. C., M. Bosche, et al. (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." Nature **415**(6868): 141-7.
- Giaever, G., A. M. Chu, et al. (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." Nature **418**(6896): 387-91.
- Giastas, P., N. Pinotsis, et al. (2006). "The structure of the 2[4Fe-4S] ferredoxin from *Pseudomonas aeruginosa* at 1.32-Å resolution: comparison with other high-resolution structures of ferredoxins and contributing structural features to reduction potential values." J Biol Inorg Chem **11**(4): 445-58.
- Gottesman, M. M. and I. Pastan (1993). "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter." Annu Rev Biochem **62**: 385-427.
- Grivell, L. A., M. Artal-Sanz, et al. (1999). "Mitochondrial assembly in yeast." FEBS Lett **452**(1-2): 57-60.
- Gubernator, B., A. Seidler, et al. (2003). "Overexpression and reconstitution of a Rieske iron-sulfur protein from the higher plant." Protein Expr Purif **29**(1): 8-14.
- Haering, C. H., D. Schoffnegger, et al. (2004). "Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction." Mol Cell **15**(6): 951-64.
- Han, A. L., T. Yagi, et al. (1989). "Studies on the structure of NADH: ubiquinone oxidoreductase complex: topography of the subunits of the iron-sulfur protein component." Arch Biochem Biophys **275**(1): 166-73.
- Hanahan, D. J. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal Molecular Biology **166** (4): 557-580.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-9.
- Holm, L. and C. Sander (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." J Mol Biol **233**(1): 123-38.
- Hopfner, K. P., L. Craig, et al. (2002). "The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair." Nature **418**(6897): 562-6.
- Hopfner, K. P., A. Karcher, et al. (2001). "Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase." Cell **105**(4): 473-85.
- Hopfner, K. P., A. Karcher, et al. (2000). "Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine." J Bacteriol **182**(21): 6036-41.
- Hopfner, K. P., A. Karcher, et al. (2000). "Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily." Cell **101**(7): 789-800.
- Hopfner, K. P. and J. A. Tainer (2003). "Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures." Curr Opin Struct Biol **13**(2): 249-55.
- Huber, C. and G. Wächtershäuser (1997). "Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial conditions." Science **276**(5310): 245-7.

- Huber, C. and G. Wächtershäuser (1998). "Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life." Science **281**(5377): 670-2.
- Hung, L. W., I. X. Wang, et al. (1998). "Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter." Nature **396**(6712): 703-7.
- Iyer, L. M., D. D. Leipe, et al. (2004). "Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases." J Struct Biol **146**(1-2): 11-31.
- Janas, E., M. Hofacker, et al. (2003). "The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p." J Biol Chem **278**(29): 26862-9.
- Johnson, D. C., D. R. Dean, et al. (2005). "Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters." Annu Rev Biochem **74**: 247-81.
- Kabsch, W. J. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." Appl. Cryst. **26**: 795-800.
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, et al. (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-7.
- Karcher, A., K. Buttner, et al. (2005). "X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly." Structure **13**(4): 649-59.
- Karpowich, N., O. Martsinkevich, et al. (2001). "Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter." Structure **9**(7): 571-86.
- Kerr, I. D. (2004). "Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition." Biochem Biophys Res Commun **315**(1): 166-73.
- Kim, J., D. Woo, et al. (1993). "X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution." Biochemistry **32**(28): 7104-15.
- Kispal, G., K. Sipos, et al. (2005). "Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria." Embo J **24**(3): 589-98.
- Kissinger, C. R., E. T. Adman, et al. (1989). "The crystal structure of the three-iron ferredoxin II from *Desulfovibrio gigas*." FEBS Lett **244**(2): 447-50.
- Kleywegt, G. J. and T. A. Jones (1997). "Template convolution to enhance or detect structural features in macromolecular electron-density maps." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 2): 179-85.
- Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." J Cell Biol **108**(2): 229-41.
- Kurihara, T., H. Mihara, et al. (2003). "Assembly of iron-sulfur clusters mediated by cysteine desulfurases, IscS, CsdB and CSD, from *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1647**(1-2): 303-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lake, J. A., J. Carr, et al. (2003). "The role of Vif during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors." J Clin Virol **26**(2): 143-52.
- Lamers, M. H., A. Perrakis, et al. (2000). "The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch." Nature **407**(6805): 711-7.

- Lamers, M. H., H. H. Winterwerp, et al. (2003). "The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair." *Embo J* **22**(3): 746-56.
- Lammens, A., A. Schele, et al. (2004). "Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases." *Curr Biol* **14**(19): 1778-82.
- Larsson, N. G., J. Wang, et al. (1998). "Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice." *Nat Genet* **18**(3): 231-6.
- Laskowski R. A., M. M. W., Moss D. S., Thornton J. M. (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." *J. Appl. Cryst* **26**: 283-291.
- Lazazzera, B. A., H. Beinert, et al. (1996). "DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from Escherichia coli are regulated by oxygen." *J Biol Chem* **271**(5): 2762-8.
- Le Master, D. M. a. R., F.M. (1985). "¹H-¹⁵N heteronuclear NMR studies of Escherichia coli thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type." *Biochemistry* **24**: 7263-7268.
- Lebbink, J. H. and T. K. Sixma (2005). "Variations on the ABC." *Structure* **13**(4): 498-500.
- Leimkuhler, S. and K. V. Rajagopalan (2001). "A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the in vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z in Escherichia coli." *J Biol Chem* **276**(25): 22024-31.
- Leipe, D. D., Y. I. Wolf, et al. (2002). "Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases." *J Mol Biol* **317**(1): 41-72.
- Lewis, H. A., S. G. Buchanan, et al. (2004). "Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Embo J* **23**(2): 282-93.
- Li, N., P. V. Warren, et al. (1991). "Polypeptide composition of the Photosystem I complex and the Photosystem I core protein from Synechococcus sp. PCC 6301." *Biochim Biophys Acta* **1059**(2): 215-25.
- Lill, R., Z. Fekete, et al. (2005). "Is there an answer? Why are mitochondria essential for life?" *IUBMB Life* **57**(10): 701-3.
- Lingappa, J. R., J. E. Dooher, et al. (2006). "Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly." *J Biol Chem* **281**(7): 3773-84.
- Liu, P. Q., C. E. Liu, et al. (1999). "Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATP-binding domains of an ABC transporter, the histidine permease." *J Biol Chem* **274**(26): 18310-8.
- Locher, K. P., A. T. Lee, et al. (2002). "The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism." *Science* **296**(5570): 1091-8.
- Lowe, J., S. C. Cordell, et al. (2001). "Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted." *J Mol Biol* **306**(1): 25-35.
- Martin, A. E., B. K. Burgess, et al. (1990). "Site-directed mutagenesis of Azotobacter vinelandii ferredoxin I: [Fe-S] cluster-driven protein rearrangement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2): 598-602.

- Martinand, C., C. Montavon, et al. (1999). "RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells." *J Virol* **73**(1): 290-6.
- Martinand, C., T. Salehzada, et al. (1998). "The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA." *J Interferon Cytokine Res* **18**(12): 1031-8.
- McPherson, A. (2002). "Introduction to Macromolecular Crystallography,." *John Wiley and Sons, New York*.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in molecular genetics." *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Moncalian, G., B. Lengsfeld, et al. (2004). "The rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function." *J Mol Biol* **335**(4): 937-51.
- Moody, J. E., L. Millen, et al. (2002). "Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters." *J Biol Chem* **277**(24): 21111-4.
- Muhlenhoff, U. and R. Lill (2000). "Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1459**(2-3): 370-82.
- Navaza, J. (1994). "AMoRe: an automated package for molecular replacement." *Acta Crystallographica Section A*(A50): 157-163.
- Nicholas, K. B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield, D.W. II., (1997). "GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation." *EMBNEW.NEWS*: 4-14.
- Oswald, C., I. B. Holland, et al. (2006). "The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us?" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**(6): 385-99.
- Otwinowski, Z. and W. Minor (1997). "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode." *Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography, Academic Press (New York) Volume 276*(Macromolecular Crystallography, part A): 307-326.
- Palmer, C. (1973). "Iron-Sulfur-Proteins." *Academic Press, New York*.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C.& Sasisekharan, V (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." *J Mol Biol* **7**: 95-99.
- Robbins, A. H. and C. D. Stout (1985). "Iron-sulfur cluster in aconitase. Crystallographic evidence for a three-iron center." *J Biol Chem* **260**(4): 2328-33.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2nd ed*: 10.27-10.37.
- Schmitt, L., H. Benabdelhak, et al. (2003). "Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains." *J Mol Biol* **330**(2): 333-42.
- Schmitt, L. and R. Tampe (2002). "Structure and mechanism of ABC transporters." *Curr Opin Struct Biol* **12**(6): 754-60.
- Senior, A. E., M. K. al-Shawi, et al. (1995). "The catalytic cycle of P-glycoprotein." *FEBS Lett* **377**(3): 285-9.
- Sheppard, D. N. and M. J. Welsh (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel." *Physiol Rev* **79**(1 Suppl): S23-45.
- Siridechadilok, B., C. S. Fraser, et al. (2005). "Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis." *Science* **310**(5753): 1513-5.

- Smith, P. C., N. Karpowich, et al. (2002). "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer." Mol Cell **10**(1): 139-49.
- Stewart, G. S., R. S. Maser, et al. (1999). "The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder." Cell **99**(6): 577-87.
- Terwilliger, T. C. (2002). "Automated structure solution, density modification and model building." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58**(Pt 11): 1937-40.
- Turk, D. (1992). "Weiterentwicklung eines Programms fuer Molekuelgraphik und Elektrondichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklaerungen." Ph.D. Thesis, Technische Universitaet, Muenchen.
- Tzagoloff, A. and C. L. Dieckmann (1990). "PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Rev **54**(3): 211-25.
- Urbina, H. D., J. J. Silberg, et al. (2001). "Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly." J Biol Chem **276**(48): 44521-6.
- van der Does, C. and R. Tampe (2004). "How do ABC transporters drive transport?" Biol Chem **385**(10): 927-33.
- van Veen, H. W., A. Margolles, et al. (2000). "The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism." Embo J **19**(11): 2503-14.
- Verdon, G., S. V. Albers, et al. (2003). "Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations." J Mol Biol **330**(2): 343-58.
- Verdon, G., S. V. Albers, et al. (2003). "Formation of the productive ATP-Mg²⁺-bound dimer of GlcV, an ABC-ATPase from *Sulfolobus solfataricus*." J Mol Biol **334**(2): 255-67.
- Walker, J. E., S. M., et al. (1982). "Distantly Related Sequences in the Alpha-Subunits and Beta-Subunits of Atp Synthase, Myosin, Kinases and Other Atp-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold." Embo Journal **1**(8): 945-951.
- Wang, C., N. Karpowich, et al. (2004). "Dynamics of ATP-binding cassette contribute to allosteric control, nucleotide binding and energy transduction in ABC transporters." J Mol Biol **342**(2): 525-37.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, et al. (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." Science **285**(5429): 901-6.
- Yarunin, A., V. G. Panse, et al. (2005). "Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins." Embo J **24**(3): 580-8.
- Zhao, Z., L. L. Fang, et al. (2004). "ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*." Biochem Biophys Res Commun **323**(1): 104-11.
- Zimmerman, C., K. C. Klein, et al. (2002). "Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids." Nature **415**(6867): 88-92.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Annette Karcher
Geburtsdatum	05.02.1968 in München
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Bildungsweg

1988	Abitur am Willi-Graf-Gymnasium, München
1988-1993	Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien, Universität Regensburg
1992-1993	Zulassungsarbeit bei Professor Wiegand am Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie
1993	1. Staatsexamen in Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien
Februar 1994-1996	Studienseminar als Referendar am Gisela Gymnasium, München
1996	2. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien
1.3.1996	sechsmonatiges Praktikum in der Abteilung Genetik (rekombinante Zellsysteme) der Boehringer Mannheim GmbH in Penzberg bei Dr. Kopetzki

Berufspraxis

1.10.1996-1.1.1999	Biologin in der Abteilung Genetik (rekombinante Zellsysteme) der Boehringer Mannheim GmbH in Penzberg bei Dr. Kopetzki und in der Abteilung Röntgenstrukturanalyse der Boehringer Mannheim GmbH angegliedert an die Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei Dr. Richard Engh
5.4.1999-1.2.2001	Research technician II am The Scripps Research Institute in La Jolla, Kalifornien. Verantwortlich für die Einarbeitung neuer Mitarbeiter (Postdocs) Wissenschaftliche Mitarbeit an der Charakterisierung der DNA Reparaturproteinen Rad50 und Mre11
01.08.2001-01.06.2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der LMU München bei Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner, Aufbau des neugegründeten Labors und

verantwortlich für die Einarbeitung von Doktoranden und Diplomanden,
Anleitung der technischen Assistentin

seit 01.06.2002

Doktorandin am Institut für Biochemie der LMU München

10. Publikationen

Karcher A, Buettner K, Märtens B, Jansen RP, Hopfner KP
X-Ray Structure of RLI, an Essential Twin Cassette ABC ATPase Involved in Ribosome Biogenesis and HIV Capsid Assembly
Structure (Camb). 2005 Apr; 13 (4):649-659

Arthur LM, Gustausson K, Hopfner KP, Carson CT, Stracker TH, **Karcher A**, Felton D, Weitzman MD, Tainer J, Carney JP (2004)
Structural and functional analysis of Mre11-3
Nucleic Acids Res. 32. 1886-93

Moncalian G, Lengsfeld B, Bhaskara V, Hopfner KP, **Karcher A**, Alden E, Tainer JA, Paull TT (2004)
The Rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function
J Mol Biol 335. 937-51

Karcher A, Hopfner KP (2002)
Die molekularen Wächter des Genoms
Bioforum 25. 384-6

Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen B, **Karcher A**, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CP, Carney JP, Petrini J, Tainer JA
Rad50 Zn hook: a novel structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair
Nature, 2002 August 1, Vol 418, 562-566

Hopfner KP, **Karcher A**, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA
Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase
Cell, 2001 May 18; 105 (4): 473-85

Hopfner KP, **Karcher A**, Shin DS, Fairley C, Tainer JA, Carney JP
Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine
J. Bacteriol. 2000 Nov; 182 (21): 6036-41

Zeslawka E, Schweinitz A, **Karcher A**, Sondermann P, Sperl S, Stürzebecher J, Jacob U
Crystals of the urokinase type plasminogen activator variant beta-UPA in complex with small molecule inhibitors open the way towards structure-based drug design
J Mol Biol., 2000 Aug 11; 301 (2): 465-75

Hopfner KP, **Karcher A**, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA
Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily
Cell 2000 Jun 23; 101 (7): 789-800

Hopfner KP, Lang A, **Karcher A**, Sichler K, Kopetzki E, Brandstetter H, Huber R, Bode W, Engh RA

Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding
Structure, 1999 Aug 15; 7 (8):989-96

Hopfner KP, Brandstetter H, **Karcher A**, Kopetzki E, Huber R, Engh RA, Bode W
Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants
EMBO J., 1997 Nov 17; 16 (22): 6626-35